



HAL
open science

Implication du canal potassium Kv3.1 dans la lipotoxicité du 7-cétocholestérol, 24S-hydroxycholestérol et de l'acide tétracosanoïque sur des cellules nerveuses 158N et BV-2: Etude des relations entre Kv3.1, homéostasie potassique et métabolisme peroxysomal dans la maladie d'Alzheimer

Maryem Bezine

► **To cite this version:**

Maryem Bezine. Implication du canal potassium Kv3.1 dans la lipotoxicité du 7-cétocholestérol, 24S-hydroxycholestérol et de l'acide tétracosanoïque sur des cellules nerveuses 158N et BV-2: Etude des relations entre Kv3.1, homéostasie potassique et métabolisme peroxysomal dans la maladie d'Alzheimer. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2017. Français. NNT : 2017UBFCI010 . tel-02137591

HAL Id: tel-02137591

<https://theses.hal.science/tel-02137591v1>

Submitted on 23 May 2019

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 TUNIS EL MANAR
Ecole Doctorale Sciences et Technologie du Vivant et de la Terre
Université de BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
Ecole Doctorale Environnement – Santé

THESE de DOCTORAT

Présentée en vue de l'obtention du titre

Docteur en Sciences Biologiques & Docteur en Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

**Implication du canal potassium Kv3.1 dans la lipotoxicité du
7-cétocholestérol, 24S-hydroxycholestérol et de l'acide tétracosanoïque sur
des cellules nerveuses 158N et BV-2**
Et
**Etude des relations entre Kv3.1, homéostasie potassique et
métabolisme peroxysomal dans la maladie d'Alzheimer**

Présentée et soutenue publiquement par

Maryem BEZINE

Le 06 Octobre 2017 à Tunis (TUNISIE)

Membres de Jury

Mme Olfa MASMOUDI	Professeure Université Tunis El Manar, Tunisie	Présidente
Mr Mohamed HAMMAMI	Professeur Université Monastir, Tunisie	Rapporteur
Mr Jean-Marc LOBACCARO	Professeur Université Clermont Ferrand, France	Rapporteur
Mr Aziz HICHAMI	Maître de conférences Université Bourgogne Franche-Comté, France	Examineur
Mr Gérard LIZARD	Chargé de Recherche Inserm Université Bourgogne Franche-Comté, France	Directeur de Thèse
Mr Mohamed EL AYEB	Professeur - Institut Pasteur-Tunis Université Tunis El Manar, Tunisie	Directeur de Thèse
Mme Rym BEN KHALIFA	Biologiste - Institut Pasteur-Tunis Université Tunis El Manar, Tunisie	Membre invité

Ce travail de Thèse de Doctorat a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique

entre

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

*Le laboratoire LVBT « Venins et Biomolécules Thérapeutiques » (Université de Tunis El
Manar / Institut Pasteur-Tunis) Tunis (Tunisie), sous la direction du Pr Mohamed EL AYEBO.*

*Ce travail a été rendu possible financièrement par le soutien du Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche (Tunisie), de l'Université Tunis El Manar, de l'Université de
Bourgogne-Franche-Comté, des CHU de Dijon et de Strasbourg (Services Neurologie) et de
l'ASSAD (Louhans, France).*

DEDICACES

*« C'est dans le présent que réside le secret;
si tu fais attention au présent tu peux le rendre meilleur.
Et si tu améliores le présent, ce qui viendra ensuite sera également meilleur. »*

Paulo Coelho

A mes parents, Merci de rendre mon présent chaque jour un peu meilleur

*A ma sœur **Yosra***

*A mes frères **Chiheb** et **Marwen***

Je vous remercie de tout cœur pour votre générosité illimitée, pour votre soutien moral et sans faille. Vous étiez présents et toujours à mes côtés dans les moments critiques et dans tout ce que j'ai pu souffrir et obtenir. Je vous adresse toute mon affection pour avoir accepté avec beaucoup de tolérance toutes mes sautes d'humeur. C'est une chance exceptionnelle de vous avoir dans ma vie.

REMERCIEMENTS

Ces quelques pages introduisent ce manuscrit, bien qu'elles signent pour moi la fin de sa rédaction. Ce mémoire met fin à l'aventure que j'ai débutée il y a quatre ans, mais ce n'est que le début d'un long chemin scientifique à parcourir avant d'atteindre un niveau satisfaisant.

Je remercie Madame la Professeure *Olfa MASMOUDI-KOUKI* d'avoir accepté de présider ce jury. J'adresse mes vifs remerciements, également, à Monsieur le Professeur *Mohamed HAMMAMI* et au Monsieur le Professeur *Jean-Marc LOBACCARO* pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette Thèse. Je les remercie pour le temps qu'ils ont consacré pour juger ce travail et pour l'honneur qu'ils me font d'évaluer ce travail. Je remercie aussi Monsieur le Docteur *Aziz HICHAMI*, Maître de Conférences, pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur. Je tiens à vous exprimer ma respectueuse considération et ma sincère gratitude. Votre examen de cette thèse et des travaux qui y sont présentés sera un privilège. Soyez assuré de ma gratitude et de mes sincères remerciements

J'aimerais remercier l'actuel Directeur du laboratoire de Venins et Biomolécules Thérapeutiques, Monsieur le Professeur *Riadh KHARAT* pour son dynamisme et sa passion pour la neurotoxicité du potassium ainsi que pour son soutien sans faille, pour son accueil très sympathique qu'il m'a accordé durant cette dernière année de thèse. Je lui suis reconnaissante de son aide scientifique et administrative.

Et c'est avec beaucoup d'émotion que je tiens à présenter ma profonde gratitude à mon directeur de Thèse au Laboratoire de Biochimie des Lipides, Inflammation et Métabolisme Lipidique, Monsieur le Docteur *Gérard LIZARD*, pour m'avoir permis de réaliser une Thèse dans son équipe. Les mots me manquent vraiment pour t'exprimer mon immense reconnaissance et il est irréaliste de penser que quelques lignes suffiront! Merci de m'avoir encadré, accordé tant de temps et donné des idées constructives et si précieux conseils. Tu as toujours été juste et encourageant, même si tout n'a pas toujours été facile, et si je sors aujourd'hui grandi de cette expérience, c'est principalement grâce à toi.

Dans la même veine, je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères au Monsieur le Professeur **Mohamed EL AYEB**, directeur de Thèse au Laboratoire de Venins et Biomolécules Thérapeutiques, pour son soutien, son encadrement et sa confiance. Je voudrais lui adresser ma profonde reconnaissance et lui dire toute mon admiration pour ses valeurs tant humaines que professionnelles.

Mes sincères remerciements sont adressés à Madame la Professeure **Isabelle DELTON** (INSA, Lyon) et à Monsieur le Professeur **Mustapha CHERKAOUI-MALKI** (Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon), membres du Comité de suivi de Thèse, pour le temps qu'ils m'ont consacré et pour les conseils judicieux qu'ils m'ont apporté.

Je souhaite également remercier sincèrement Madame le Docteur **Rym BENKHALIFA**, Chef de l'équipe d'électrophysiologie au laboratoire Venins et Biomolécules Thérapeutiques, pour son aide précieuse, sa patience et pour le temps qu'elle a consacré à suivre de près l'évolution de ma Thèse. Je remercie aussi Madame le Docteur **Catherine DESRUMAUX** (Inserm, Montpellier, France) pour m'avoir procuré les souris transgéniques Alzheimer J20 et pour le temps consacré sur ce modèle dans le cadre de ma Thèse ainsi que le Prof. **Mohammad SAMADI** (Université de Lorraine, Metz, France) pour la synthèse des oxystérols.

Un merci tout spécial à Madame le Docteur **Amira ZARROUK** pour sa précieuse contribution à ce travail, ses conseils, et nos échanges scientifiques qui m'ont largement inspiré et m'inspireront encore. Je te remercie pour ta gentillesse, ton soutien, ta bonté, ta patience et ta sincérité.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du laboratoire Venins et Biomolécules Thérapeutiques et du laboratoire de Biochimie des Lipides, Inflammation et Métabolisme Lipidique, que j'ai eu l'honneur de rencontrer au cours de cette Thèse.

Je souhaite adresser un chaleureux remerciement au Madame le Docteur **Sana RIABI** pour son soutien indéfectible, ses conseils et encouragements tout au long de ma Thèse.

Merci aussi à Madame le Docteur **Amani BECHIKH** pour son assistance en électrophysiologie et pour l'aide qu'elle a pu m'apporter à un moment ou un autre.

Un grand merci aussi à Madame **Najla LBBEN**, technicienne principal du service de biochimie de l'Institut Pasteur de Tunis, pour la qualité des dosages de potassium.

Merci à **Thomas NURY** pour m'avoir montré comment fonctionne les différents équipements et pour trouver tous les petits réactifs cachés dans les tiroirs qui m'ont aidé à un moment ou un autre.

Un grand merci au Centre de Pathologie, aux techniciennes du laboratoire d'Immunologie et au Docteur **Patrick ROIGNOT** qui m'ont permis de me familiariser avec la cytochimie et l'immunohistochimie. Merci au Docteur **Jean-Paul PAYS de BARROS** de la plateforme de lipidomique de l'Université de Bourgogne et au Docteur **Pierre-Yves RISOLD** de l'Université de Franche-Comté pour leurs expertises respectives en Biochimie Analytique et en Neuroanatomie. Merci aussi aux Professeurs **Thibault MOREAU** (Service Neurologie, CHU, Dijon, France) et **Jérôme de SEZE** (Service Neurologie, CHU, Strasbourg, France) pour leurs soutiens financiers apportés à la réalisation de cette étude.

Je remercie tout particulièrement et grandement les thésards du laboratoire Bio-peroxIL, **Amira, Wiem, Asmaa, Fatima, Quentin, El Mostafa** et **Tugba** pour leur soutien et les discussions que l'on a pu avoir.

Je voudrais adresser un immense merci à toute l'équipe de Venins et Biomolécules Thérapeutiques, tout particulièrement **Asma, Hazar, Saida, Hajer, Rym, Zayneb, Asma, Dora, Maram, Abir, Chiheb, Chedli, Imen, Housseem, Oussema, Yassine, Imèn** et **Wassim**. Vous êtes pour moi plus que des collègues de travail. Dès mon premier passage, il y a maintenant 4 ans, j'ai tout de suite senti une ambiance et une convivialité incroyable. On ne peut espérer de meilleures conditions pour effectuer une Thèse. J'ai tellement appris grâce à vous tous, je vous en suis infiniment reconnaissant.

Merci à **Sonia MAATOUG** qui m'a énormément aidé, par son expérience en électrophysiologie, sa disponibilité et son enthousiasme. C'est toujours agréable et un vrai plaisir de travailler avec toi, Sonia!

Thanks to **Saad SHAABEN** and **Danish PATHOLI**, Thanks to improve my English. My last question is who will eat our THESIS?

Merci du fond du coeur à mes amis, les cousins **Mohamed**, avec qui j'ai passé des moments inoubliables.

Merci à *Besma, Selma, Meryam, Jana* et *Nadia* pour toute la tendresse qu'elles m'ont donné et qu'elles me donnent au quotidien. Cette Thèse n'aurait pas été une si belle aventure sans vous.

Bohra, ces 11 années d'études ont été aussi plaisantes, c'est sans aucun doute grâce à toi. Ton réconfort, ton soutien et ton amour apaisent tous mes mots.

Merci *Fatin*, pour les bons moments passés ensemble.

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1: Évolutions de l'espérance de vie depuis 1950, avec projection jusqu'en 2050, par région de l'OMS et dans le monde.....</i>	<i>7</i>
<i>Figure 2: Évolutions de la proportion de la population âgée de 60 ans ou plus depuis 1950, projection jusqu'en 2050.....</i>	<i>8</i>
<i>Figure 3: Période nécessaire ou estimée pour que le pourcentage de la population âgée de 60 ans et plus passe de 10 % à 20 %.....</i>	<i>8</i>
<i>Figure 4: Progression clinique de la maladie d'Alzheimer.....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 5: Représentation schématique des différents systèmes de mémoire atteints au cours de l'évolution de la maladie d'Alzheimer.....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 6: Caractéristiques anatomo-pathologiques de la maladie d'Alzheimer.....</i>	<i>17</i>
<i>Figure 7: Photomicrographie des lésions pathologiques du cortex frontal de patient atteint de la Maladie d'Alzheimer présentant à la fois la présence des plaques amyloïdes(A) et du dégénérescence neurofibrillaire (B), visualisées à l'aide d'une coloration à l'argent.....</i>	<i>18</i>
<i>.....</i>	<i>19</i>
<i>Figure 8: Dégénérescence neurofibrillaire.....</i>	<i>19</i>
<i>Figure 9: Immunomarquage des plaques amyloïdes en utilisant un anticorps anti-Aβ.....</i>	<i>21</i>
<i>Figure 10 : Représentation schématique de l'APP.....</i>	<i>22</i>
<i>Figure 11: Clivage de l'APP et génération des peptides Aβ.....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 12: Evolution stéréotypée de la pathologie Tau.....</i>	<i>26</i>
<i>Figure 13: Couplage métabolique astrocyte-neurone.....</i>	<i>29</i>
<i>Figure 14: Activation d'une cellule microgliale, du stade quiescent (faiblement ramifié) au stade amyboïde.....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 15: Modulation des canaux potassium à rectification retardé et différenciation des cellules progénitrices oligodendrocytaires (OPC).....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 16: Interaction entre neurone et oligodendrocyte.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 17: Incidence du dysfonctionnement peroxysomal dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives.....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 18: Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule.....</i>	<i>46</i>
<i>Figure 19: Schéma de défenses antioxydantes enzymatiques.....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 20: Rôle de l'équilibre redox intra-cellulaire dans le développement, le vieillissement et dans l'installation du processus pathologique.....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 21: Interraction du 4-hydroxynonéal avec différentes biomolécules.....</i>	<i>51</i>
<i>Figure 22: Principales voies de synthèse du cholestérol.....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 23: Elimination du cholestérol cérébral par conversion en 24S-hydroxycholestérol).....</i>	<i>59</i>
<i>Figure 24: Formation des dérivés oxydés du cholestérol ou oxystérols.....</i>	<i>60</i>

Figure 25: Modèle de régulation de l'efflux du cholestérol par LXR en réponse à une charge en oxystérol.	65
Figure 26: Représentation schématique de l'orientation membranaire du cholestérol, du 7KC et du 25-OHC	68
Figure 27: Implication des oxystérols lors de la progression de la maladie d'Alzheimer	70
Figure 28: Diversité des lipides plasmatiques humains	73
Figure 29: Différentes classes de canaux K^+	85
Figure 30: Topologie membranaire des sous-unités potassiques à 6 segments transmembranaires et 1 boucle P dépendante du potentiel.	86
Figure 31: Représentation de la 4-aminopyridine	89
Figure 32: Structure de la Merocyanine 540 (MC 540)	107
Figure 33: Structure de la sonde DiSBAC2(3)	108
Figure 34: Structure de la sonde PBFI-AM	109
Figure 39: Observation des cellules I58N par microscopie en contraste de phase.	132
Figure 40: Observation des cellules BV-2 par microscopie en contraste de phase.	133
Figure 41: Effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur la prolifération cellulaire	135
Figure 42: Numération des cellules mortes en présence du 7KC, 24S-OHC et C24:0	136
Figure 43: Effets du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique des oligodendrocytes murins I58N	137
Figure 44: Effets du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique des cellules microgliales murines BV-2	138
Figure 45: Effets du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur le potentiel transmembranaire mitochondrial des oligodendrocytes murins I58N	139
Figure 46: Effets du 7KC, du 24S-OHC et du C24:0 sur le potentiel transmembranaire mitochondrial des cellules microgliales murines BV-2	141
Figure 47: Mesure de la production d'anions superoxydes intracellulaires sur des oligodendrocytes murins I58N	142
Figure 48: Mesure de la production d'anions superoxydes sur des cellules microgliales murines BV-2 ..	143
Figure 49: Effets de 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur la concentration intracellulaire du K^+ ($[K^+]_i$) mesurée par photométrie de flamme	145
Figure 50: Effets de 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur la concentration intracellulaire du K^+	146
Figure 51: Corrélation de Pearson entre la concentration intracellulaire du K^+ ($[K^+]_i$) et le pourcentage des cellules DiOC6 (3) négatives, HE positives et IP positives.	148
Figure 52: Effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur l'organisation des lipides membranaires.	150
Figure 53: Effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur le potentiel membranaire.	151
Figure 54: Exacerbation des changements morphologiques et de la perte de l'adhésion cellulaire induites par le 7KC, 24S-OHC et C24:0 par la 4-AP	153
Figure 55: Evaluation de l'effet de l'inactivation des canaux voltage dépendant par la 4-AP sur le potentiel transmembranaire mitochondrial et sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique.	155
Figure 56: Analyse de l'effet de l'inactivation des canaux voltage dépendant sur de la mort cellulaire induite par 7KC, 24S-OHC et C24:0	156

Figure 57: Activation du clivage de pro-caspase 3 et de PARP par le 7KCet le 24S-OHC en présence de la 4-AP.....	158
Figure 58: Identification de l'expression de Kv3.1 par les oligodendrocytes murins I58N et les cellules microgliales murines BV-2.....	160
Figure 59: Analyse des effets de 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur l'expression de Kv3.1b sur les oligodendrocytes murins I58N.....	162
Figure 60: Analyse des effets de 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur l'expression de Kv3.1b sur les cellules microgliales murine BV-2.....	163
Figure 61: Correlation de Pearson entre l'expression de Kv3.1b et la concentration intracellulaire du K ⁺ ([K ⁺]).	164
Figure 62: Correlation de Pearson entre l'expression de Kv3.1bet le pourcentage des cellules DiOC6 (3) négatives, HE positives et IP positives.....	167
Figure70: Marquage immunohistochimique du peptide Aβ 17-24 dans les régions hippocampiques (CA1, CA2, CA3 et GD) et l'ensemble des cortex occipital, pariétal et entorhinal sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois; CA : Corne d'Ammon, DG : gyrus denté (coupes d'épaisseur de 8 μm ; revelation de l'expression à la DAB et contre coloration à l'hémalum).	176
Figure 71: Marquage immunohistologique des plaques séniles dans les régions hippocampiques (CA1, CA2, CA3 et GD) et l'ensemble des cortex occipital, pariétal et entorhinal sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois; DG : gyrus denté, CA : Corne d'Ammon.	177
Figure 72: Expression représentative de Kv3.1b dans les régions hippocampiques (CA1, CA2, CA3 et GD) sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois; CA : Corne d'Ammon, DG : gyrus denté (coupes d'épaisseur de 8 μm ; revelation de l'expression à la DAB et contre coloration à l'hémalum).	179
Figure 73: Expression représentative de Kv3.1b dans le subiculum sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois (coupes d'épaisseur de 8 μm ; revelation de l'expression à la DAB et contre coloration à l'hémalum).	180
Figure 74: Expression représentative de Kv3.1b dans l'ensemble des cortex pariétal, occipital, entorhinal et frontal sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois (coupes d'épaisseur de 8 μm ; revelation de l'expression à la DAB et contre coloration à l'hémalum). ...	181
Figure 75: Expression représentative d'Abcd3 dans les régions hippocampiques (CA1, CA2, CA3 et GD) sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois; CA : Corne d'Ammon, DG : gyrus denté (coupes d'épaisseur de 8 μm ; revelation de l'expression à la DAB et contre coloration à l'hémalum).	182
Figure 76: Expression représentative d'Abcd 3 dans le subiculum sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois (coupes d'épaisseur de 8 μm ; revelation de l'expression à la DAB et contre coloration à l'hémalum).	183
Figure 87: Expression représentative d'Abcd3 dans l'ensemble des cortex pariétal, occipital, entorhinal et frontal sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois (coupes d'épaisseur de 8 μm ; revelation de l'expression à la DAB et contre coloration à l'hémalum). ...	184
Figure 78: Topographie de Kv3.1 et d'Abcd3 au niveau des cellules de Purkinjesur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois (coupes d'épaisseur de 8 μm ; revelation de l'expression à la DAB et contre coloration à l'hémalum).	185

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Antigènes spécifique des différentes étapes de maturation des ligodendrocytes	37
Tableau 2. Modifications Oxydatives des canaux ioniques	53
Tableau 3. Enzymes impliquées dans la synthèse d'oxystérols.....	61
Tableau 4. Composition des différents types de gel d'acrylamide.....	112
Tableau 5. Conditions d'utilisation des anticorps primaires et secondaires	114
Tableau 6. Anticorps utilisés en immunohistochimie et conditions techniques.....	124
Tableau 7: Valeurs moyennes des taux plasmatiques de C22:0, AGTLCs et DHA chez les patients Alzheimer et les contrôles.....	172
Tableau 8: Corrélation de Spearman entre les concentrations plasmatiques du potassium et celles de C22:0, des AGTLCs (C24:0 et C26:0) et du DHA (C22:6 n-3).....	172
Tableau 9: Profil plasmatiques et érythrocytaire des acides gras en relation avec le métabolisme peroxysomale chez les souristransgénique J20 et les souris contrôles	186
Tableau 10: Profil plasmatiques et érythrocytaire des oxystérols chez les souris transgénique J20 et les souris contrôles.....	187

LISTE DES ABREVIATIONS

4-AP :	4-Aminopyridine
4-HNE :	4-hydroxynonéal
$\Delta\psi_m$:	Potentiel transmembranaire mitochondrial
7KC :	7-cétocholestérol
7 β -OHC :	7 β -hydroxycholestérol
7 α -OHC :	7 α -hydroxycholestérol
24S-OHC :	24S- hydroxycholestérol
25-OHC :	25-hydroxycholestérol
27-OHC :	27-hydroxycholestérol
[K ⁺] _i :	Concentration intracellulaire de potassium
AAC :	Angiopathies Amyloïdes Cérébrales
A β :	Amyloïde β
ABC :	ATP-Binding Cassettes
ABCD :	ATP-Binding Cassettes de la sous famille D
ACOX1 :	Acyl-CoA oxydase 1
AC :	Adényl Cyclase
AG :	Acide Gras
AGPI :	Acides Gras Polyinsaturés
AGTLC :	Acides Gras à Très Longue Chaîne
AMPK :	AMP-activated protein kinase
AMPc :	Adénosine Mono Phosphate cyclique
APP :	Amyloid Precursor Protein

ApoE4 : Apolipoprotéine E 4

ATP : Adénosine tri-phosphate

BHE : Barrière Hemato Encéphalique

CA : Corne d'Ammon

Ca²⁺ : Calcium

CCALD : Childhood Cerebral ALD

CCALD : Childhood Cerebral ALD

Cl⁻ : Chlorure

COX-2 : Cyclo-oxygénase 2

CYP P450 : Cytochromes P450

CYP46A1 : 24-hydroxylase

CYP27A1 : 27-hydroxylase

CYP7A1 : 7 α -hydroxylase

DAB : Chromogène-Substrat, Dako

DHA : Acide docosaénoïque

DiOC6(3) : 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide

DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age

DNF : Dégénérescences Neurofibrillaires

DPA : Acide docosapentaénoïque

EPA : Acide eicosapentaénoïque

EtOH : Ethanol

GD : Gyrus Denté

Gmax : Conductance maximale

GSH : glutathion réduit

GSSG :	glutathion oxydé
HDL :	lipoprotéine de haute densité
hERG3:	Human erythroblast transformation-specific related gene 3
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HRP :	Peroxydase
Hoechst :	2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5' bi 1H-benzimidazole)
I :	Intensité du courant membranaire
IA :	Courants potassiques transitoires
IK _{DR} :	Canaux à rectification retardée
IP :	Iodure de Propidium
K ⁺ :	Potassium
Kir :	Canaux à rectification entrante
Kv :	Canaux potassium voltage dépendant
LXR :	Liver X Receptors
MA :	Maladie d'Alzheimer
MAG :	Myelin Associated Glycoprotein
MBP :	Myelin Basic Protein
MBS :	Solution de Barth modifiée
MC 540 :	Merocyanine 540
MMP-9 :	Métallo-protéinase 9
MOG :	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
Na ⁺ :	Sodium
NMDAR :	Récepteurs : N-méthyl-D-aspartate
NO :	Monoxyde d'azote

O :	Oxygène singulet
OH•:	Radical hydroxyl
ONOO ⁻ :	Peroxynitrite
ONOOH :	Acide peroxynitreux
ONOOH :	Nitropéroxyde
OPC :	Cellules Progénitrices Oligodendrocytaires
PARP:	Poly (ADP-ribose) Polymérase
PLP:	Myelin Proteolipid Protein
P-NALD :	Pseudo Neonatal Adrenoleukodystrophies
PPAR α :	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α
RNS :	Reactive Nitrogen Species
RO• :	Radical alcoxyl
ROO• :	Radicaux peroxyls
ROS :	Reactive Oxygen Species
RXR :	Retinoid X Receptor
TCA :	Acide tricarboxylique
TEA :	Triéthylammonium
SNC :	Système Nerveux Central
SEP :	Sclérose en plaques
SREBP :	Sterol Responsive Element Binding Protein
V :	Potentiel membranaire
X-ALD :	X-linked Adrenoleukodystrophy

TABLE DES MATIÈRES

<i>INTRODUCTION GENERALE</i>	1
<i>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	6
I. Maladie d'Alzheimer	7
1. Vieillissement.....	7
1.1. Vieillissement de la population mondiale	7
1.2. Vieillissement et maladie d'Alzheimer	8
2. Prévalence de la maladie d'Alzheimer	10
3. Symptomatologie et évolution de la maladie d'Alzheimer	11
4. Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer	13
4.1. Les facteurs de risque génétique	14
4.2. Les facteurs de risque environnementaux	16
5. Neuropathologie	16
5.1. Aspects morphologiques.....	16
5.2. Aspects microscopiques.....	17
5.2.1. La dégénérescence neurofibrillaire	18
5.2.2. Les plaques amyloïdes	20
5.2.3. Autres lésions microscopiques associées à la maladie d'Alzheimer	24
5.2.4. Localisation des lésions	25
6. Acteurs cellulaires au niveau du système nerveux central	26
6.1. Les astrocytes	27
6.1.1. Caractéristiques membranaires et électrophysiologiques des astrocytes	27
6.1.2. Contribution des astrocytes dans la Maladie d'Alzheimer	30
6.2. Les cellules microgliales.....	31
6.2.1. Propriétés et activités microgliales	31
6.2.2. Contribution des cellules microgliales dans la Maladie d'Alzheimer	33
6.3.1. Origine, maturation et activités des oligodendrocytes.....	34
6.3.2. Contribution des oligodendrocytes dans la maladie d'Alzheimer	39
7. Maladie d'Alzheimer et altérations des organites cellulaires.....	41
7.1. Implication des mitochondries dans la physiopathologie de la MA	41
7.2. Implication des peroxysomes dans la physiopathologie de la MA.....	42
II. Processus toxiques associés à la maladie d'Alzheimer	44
1. Stress oxydant	44

1.1. Différentes formes de radicaux libres	44
1.2. Défenses antioxydantes	46
1.3. Cibles cellulaires du stress oxydatif.....	48
1.4. Rôles du stress oxydant dans la maladie d'Alzheimer	54
2. Métabolisme lipidique	56
2.1. Métabolisme du cholestérol	56
2.1.1. Métabolisme du cholestérol cérébral	55
2.1.2. Élimination du cholestérol cérébral	58
2.2. Oxydation du cholestérol : les oxystérols	60
2.2.1. Oxydation enzymatique	61
2.2.2. Auto-oxydation.....	64
2.2.3. Oxystérols et régulation de l'efflux du cholestérol : Récepteurs nucléaires LXR	64
2.2.4. Action des oxystérols sur la membrane plasmique	66
2.2.5. Activités cytotoxiques des oxystérols	68
2.2.6. Oxystérols et pathologies neurodégénératives	69
2.3. Métabolisme des acides gras.....	73
2.3.1. Approvisionnement cellulaire en acides gras	73
2.3.2. Métabolisme des acides gras et Maladie d'Alzheimer	75
3. Altération de l'homéostasie ionique intracellulaire.....	83
3.1. Structure et classification.....	85
3.2. Canaux potassiques voltage-dépendant	87
3.2.1. Mécanismes d'activation et d'inactivation.....	88
3.2.2. Intérêt d'utilisation de la 4-Aminopyridine.....	89
3.2.3. La sous famille des Kv3 : focus sur Kv3.1.....	90
III. Modèles animaux de la MA.....	92
1. Choix d'un modèle animal de la MA	92
2. Les souris transgéniques comme modèles de la MA	93
2.1. Les souris simple-transgéniques	93
2.2. Les souris double-transgéniques	93
2.3. Les souris triple-transgéniques	94
PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL	97
PARTIE EXPÉRIMENTALE	99
I. Etude <i>in vitro</i>	100
1. Modèles cellulaires : Oligodendrocytes 158N et cellules microgliales BV-2	100
1.1. Caractéristiques des cellules 158N et BV-2.....	100
1.2. Culture et traitements des 158N et BV-2	100

2. Analyse de la morphologie cellulaire	102
2.1. Analyse de la morphologie nucléaire par microscopie à fluorescence après coloration à Hoechst 33342.....	102
3. Étude de la viabilité cellulaire	103
3.1. Dénombrement cellulaire par cytométrie en flux	103
3.2. Numération cellulaire en présence de bleu trypan	103
3.3. Analyse du potentiel transmembranaire mitochondrial par le 3,3' dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC ₆ (3)).....	104
3.4. Evaluation de la production d'anions superoxydes par cytométrie en flux	105
3.5. Evaluation de l'intégrité de la membrane cytoplasmique par coloration à l'iodure de propidium (IP).....	105
3.6. Étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux :détection des cellules en Sub-G1	106
4. Mesure de la fluidité membranaire par cytométrie en flux après coloration à la Merocyanine 540 (MC 540).....	107
5. Mesure du potentiel membranaire par spectrophotométrie après coloration par la sonde DiBAC2(3).....	108
6. Mesure de la concentration intracellulaire du potassium	109
6.1. Mesure par la sonde PBFI-AM.....	109
6.2. Mesure du potassium par photomètre à flamme	110
7. Immunofluorescence indirecte.....	110
8. Quantification de l'expression protéique par Western blot.....	111
8.1. Extraction et dosage des protéines	111
8.2. Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	112
8.3. Transfert des protéines.....	113
8.4. Immunorévélation des protéines	113
9. Techniques d'électrophysiologie	114
II. Etude <i>in vivo</i>	120
1. Description du modèle murin	120
2. Analyses immunohistologiques et immunohistochimiques sur coupes de cerveaux.....	122
3. Analyses du profil lipidique sur plasma et érythrocytes par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	124
3.1. Analyse de la composition en acides gras	124
3.2. Analyse de la composition en cholestérol et ses dérivés oxydés (oxystérols)	125
III. Tests statistiques.....	127
RÉSULTATS	129
A. Etude <i>in vitro</i> sur cellules 158N et BV-2.....	130
1. Evaluation de la cytotoxicité du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur des cellules 158N et BV-2 : Impact sur la concentration du potassium intracellulaire	130

1.1. Effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur la prolifération et la viabilité cellulaire	131
1.2. Evaluation des effets du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur le potentiel transmembranaire mitochondrial	139
1.3. Evaluation du stress oxydant induit par le 7KC, 24S-OHC et C24:0.....	141
1.4. Effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur la concentration intracellulaire de potassium	143
1.4.1. Mesure du potassium intracellulaire par photométrie de flamme.....	143
1.4.2. Mesure du potassium intracellulaire avec le fluorochrome PBFI-AM	145
1.5. Evaluation de corrélation entre la concentration intracellulaire du potassium et la cytotoxicité du 7KC, 24S-OHC et C24:0.....	147
1.6. Effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur la structure de la membrane plasmique	149
1.7. Evaluation du potentiel de la membrane plasmique sous l'effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0.....	150
1.8. Incidence de la concentration intracellulaire de potassium sur la cytotoxicité induite par le 7KC, 24S-OHC et C24	152
2. Implication de Kv3.1 dans la lipotoxicité microgliale et oligodendrocytaire du 7KC, 24S-OHC et C24:0.....	159
2.1. Evaluation de l'expression de Kv3.1 dans les oligodendrocytes murins 158N et les cellules microgliales BV-2	159
2.2. Effet de 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur l'expression de Kv3.1b	160
2.3. Corrélation entre expression de Kv3.1b et concentration intracellulaire de potassium	164
2.4. Corrélation entre expression de Kv3.1b, stress oxydant et mort cellulaire.....	165
3. Effets du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur le courant Kv3.1	168
B. Relations entre le taux de potassium plasmatique et le métabolisme peroxysomal chez des patients Alzheimer tunisiens.....	171
C. Etude de l'expression de Kv3.1b sur des souris transgéniques J20 utilisées comme modèle de la maladie d'Alzheimer	173
1. Révélation des dépôts amyloïdes sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris transgéniques J20	175
2. Etude de l'expression de Kv3.1b et du marqueur de masse peroxysomale (Abcd3) sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris transgéniques J20	178
3. Profil d'acides gras et d'oxystérols plasmatique et érythrocytaire	185
DISCUSSION	188
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	216
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	225
ANNEXES	284

LISTE DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES

Publications internationales dans des revues à comité de lecture

Article 1

Bezine M, Debbabi M, Nury T, Ben Khalifa R, Samadi M, Cherkaoui-Malki M, Vejux A, de Sèze J, Moreau T, El Ayeb M, Lizard G. *Evidence of K^+ homeostasis disruption in cellular dysfunction triggered by 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol, and tetracosanoic acid (C24:0) in 158N murine oligodendrocytes: exacerbation of lipotoxicity by the universal Kv channel blocker, 4-aminopyridine.* **Chem Phys Lipids 2017; pii: S0009-3084(17)30011-7. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2017.03.006.**

Article 2

Bezine M, Debbabi M, Nury T, Ben Khalifa R, Zarrouk A, Maatoug S, de Sèze J, Moreau T, Samadi M, El Ayeb M, Lizard G. *Modulation of Kv3.1b potassium channel expression and intracellular potassium level in 158N murine oligodendrocytes and BV-2 murine microglial cells treated with 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid (C24:0).* **J Cell Biochem 2017 (en révision).**

Article 3

Debbabi M, Zarrouk A, Nury T, **Bezine M**, Badreddine A, El Mostafa K, Grégoire S, Martine L, Guyot S, Bretillon L, Malki M, Moreau T, Nasser B, Hammami M, Lizard G. *Comparison of the effects of major fatty acids present in the Mediterranean diet (oleic acid, docosahexaenoic acid) and in hydrogenated oils (elaidic acid) on 7-ketocholesterol-induced oxidative stress and oxiaoptophagy on microglial BV-2 cells.* **Chem Phys Lipids 2017; pii: S0009-3084(16)30188-8. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2017.04.002.**

Article 4

Brahmi F, Samia H, Zarrouk A, **Bezine M**, Nury T, Madani K, Mohamed C, Vejux A, Andreoletti P, Boulekbache M, Lizard G. *Evidences of biological activities of Mentha species extracts on apoptotic and autophagic targets on murine RAW264.7 and human U937 monocytic cells.* **Pharm Biol 2017; 55(1): 286-293.**

Article 5

Debbabi M, Nury T, Zarrouk A, Mekahli N, **Bezine M**, Grégoire S, Martine L, Durand P, Vejux A, Jabrane A, Bretillon L, Prost M, Fromont A, Moreau T, Hammami M, Lizard G. *Protective effects of α -Tocopherol, γ -Tocopherol, and Oleic Acid, three compounds of olive oils, and no effect of Trolox on 7-Ketocholesterol-Induced Mitochondrial and Peroxisomal Dysfunctions on Microglial BV-2 Cells.* **Int J Mol Sci** 2016;**25**; 17(12).

Article 6

Debbabi M, Nury T, Helali I, Karym EM, Geillon F, Gondcaille C, Trompier D, Najid A, Terreau S, **Bezine M**, Zarrouk A, Vejux A, Andreoletti P, Cherkaoui-Malki M, Savary S, Lizard G. *Flow Cytometric Analysis of the Expression Pattern of Peroxisomal Proteins, Abcd1, Abcd2, and Abcd3 in BV-2 Murine Microglial Cells.* **Methods Mol Biol.** 2017;**1595**: 257-265.

Article 7

Zarrouk A, Debbabi M, **Bezine M**, El Mostafa K, Baddredine A, Rouaud O, Moreau T, El Ayeb M, Nasser B, Hammami M, Lizard G. *Lipid Biomarkers in Alzheimer's Disease.* **Curr Alzheimer Res.** 2017 doi: 10.2174/1567205014666170505101426.

Communications présentées à des Congrès Nationaux et Internationaux

Communication Orale

-European Lipidomic Meeting (ELM), 10-12 Avril 2017, Toulouse, France.

Bezine M, Debbabi M, Nury T, Ben Khalifa R, Zarrouk A, Maatoug S, de Sèze J, Moreau T, Samadi M, El Ayeb M, Lizard G. Modulation of Kv3.1b potassium channel expression and intracellular potassium level in 158N murine oligodendrocytes and BV-2 murine microglial cells treated with 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid (C24:0).

Communications affichées

- FORUM des Jeunes Chercheurs 18-19 Juin 2015, Faculté des Sciences Gabriel, Dijon, France

Bezine M, Zarrouk A, Maatoug S, Nury T, Ben Khalifa R, El Ayeb M, Lizard G. Effects of 7-ketocholesterol (7KC), 24(S)-hydroxycholesterol (24S-OHC) and tetracosanoic acid (C24:0) on voltage-gated potassium channel Kv3.1 expression and intracellular potassium levels on murin oligodendrocytes cells.

-Journées Internationales de Biotechnologie - JIB 2015, 20-24 Décembre 2015, Djerba, Tunisie

Bezine M, Zarrouk A, Maatoug S, Nury T, Ben Khalifa R, El Ayeb M, Lizard G. Effects of 7-ketocholesterol (7KC), 24(S)-hydroxycholesterol (24S-OHC) and tetracosanoic acid (C24:0) on voltage-gated potassium channel Kv3.1 expression and intracellular potassium levels on murin oligodendrocytes cells.

-10th FENS Forum of Neuroscience, 3-5 May 2016, Copenhagen, Denmark

Bezine M, Zarrouk A, Maatoug S, Nury T, Ben Khalifa R, El Ayeb M, Lizard G. Involvement of kv3.1 in 7-ketocholesterol-, 24(S)-hydroxycholesterol- and tetracosanoic acid-induced lipotoxicity on murine oligodendrocytes 158N: Impact on cytosolic potassium level.

- Réunion francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés, 8-10 Juin 2016, Lyon, France

Bezine M, Zarrouk A, Maatoug S, Nury T, Ben Khalifa R, El Ayeb M, Lizard G. Cytosolic K⁺ increase in 158N murine oligodendrocytes cells treated with 7 Ketocholesterol and 24S-hydroxycholesterol induced mitochondrial dysfunction and cell death.

- 5th Open European Peroxisome Meeting (OEPM), Peroxisomes in Health and Disease. 14-16 September 2016, Vienna, Autriche

Nury T, Debbabi M, Zarrouk A, Ménétrier F, Sghaier R, Badreddine A, El Mostafa K, **Bezine M**, Vejux A, Savary S, Malki M, Moreau T, Aubourg P, Lizard G. Incidence of 7-ketocholesterol, a cholesterol auto-oxidation product found at enhanced level in the plasma of X-ALD patients, on oligodendrocytes and microglial cells dysfunctions.

-Workshop NutriOx 2016, Nutrition and Ageing, 21-23 September 2016, Kaiserslautern, Allemagne

Bezine M, Zarrouk A, Nury T, Debbabi M, Desrumaux C, RISOLD P, El Ayeb M, LIZARD G. Incidence of oxidative stress and lipid environment on the expression of voltage gated potassium channel (Kv3.1) in the context of Alzheimer's disease: in vivo and in vitro study.

-6th ENOR symposium, 29-30 September 2016, Paris, France

Bezine M, Debbabi M, Nury T, Ben Khalifa R, El Ayeb M, Lizard G. Evidence of K⁺ homeostasis disruption and potential involvement of Kv channels in cellular dysfunctions triggered by 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol, and tetracosanoic acid on 158N oligodendrocytes.

INTRODUCTION GENERALE

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative caractérisée par une perte progressive et irréversible de la mémoire et des fonctions cognitives. En plus d'une atrophie cérébrale et d'une perte de transmission synaptique, deux caractéristiques histopathologiques majeures en lien avec des dérégulations protéiques sont retrouvées chez les patients atteints de la MA : les plaques séniles extracellulaires composées de peptides β - amyloïdes ($A\beta$) fibrillaires et la dégénérescence neurofibrillaire constituée d'agrégats intracellulaires de protéines Tau hyper et anormalement phosphorylées (**Thompson *et al.*, 2012**). Plusieurs études épidémiologiques réalisées en prenant en compte différents paramètres ont prouvé que la MA est une maladie complexe dont le développement s'opère en plusieurs années et met en jeu de nombreux processus cellulaires et moléculaires différents.

Implication des lipides dans la physiopathologie de la MA

Le dysfonctionnement du métabolisme lipidique a été associé à la physiopathologie de la MA comme la quantité de cholestérol intracérébral qui augmente au début de la maladie (**Wood *et al.*, 2002**; **Cutler *et al.*, 2004**). Dans les conditions non-pathologiques, l'excès de cholestérol est éliminé par oxydation enzymatique ou par auto-oxydation. La voie CYP46 constitue la voie majoritaire d'élimination d'excès de cholestérol cérébral sous forme de 24S-hydroxycholestérol (24S-OHC). Les taux de 24S-OHC et de 27-hydroxycholestérol (27-OHC), formés par oxydation enzymatique de cholestérol, au niveau du cortex frontal des patients MA dépendent des stades cliniques de la MA et contrôlent les fonctions cognitives, la mémoire et l'apprentissage (**Heverin *et al.*, 2004** ; **Kotti *et al.*, 2006** ; **Leoni *et al.*, 2009**). Le 7-cétocholestérol (7KC) et le 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC) qui résultent de l'auto-oxydation du cholestérol, ainsi que le 24S-OHC, sont aussi associés à des activités pro-apoptotiques impliquant des dysfonctions mitochondriales et des effets pro-oxydants et/ou pro-inflammatoires (**Delatorre *et al.*, 2002** ; **Vaya & Schipper, 2007** ; **Vejux & Lizard, 2009** ; **Noguchi *et al.*, 2015**). En raison de la toxicité induite par ces différents oxystérols, dont les caractéristiques évoquent les dysfonctions associées à la MA, il est très probable que ces oxystérols, dont les taux sont souvent augmentés au niveau du plasma, des érythrocytes, du cerveau et du liquide céphalorachidien des malades avec une MA, soient impliquées dans la physiopathologie de cette maladie (**Zarrouk *et al.*, 2014**).

Pour cette raison, il est important de mieux connaître les mécanismes moléculaires de ces oxystérols sur différents types de cellules nerveuses.

Par ailleurs, des accumulations de l'acide docosanoïque (C22:0) et des acides gras à très longue chaîne (AGTLC) (C24:0 et C26:0) ont aussi été révélées dans le plasma ainsi qu'au niveau des régions corticales du cerveau de patients avec une MA à l'exception du parasubiculum (**Kou et al., 2011; Zarrouk et al., 2015**). Chez des MA, des taux de C26:0 beaucoup plus importants que chez les sujets sains ont été observés ce qui a conduit à proposer cet AGTLC comme biomarqueur sanguin de la MA (**Zarrouk et al., 2015**). Ces observations suggèrent des altérations du métabolisme lipidique (**Zarrouk et al., 2015**) qui pourraient correspondre soit à une augmentation d'activité de certaines élongases et/ou à des dysfonctions du peroxysome et en particulier de la β -oxydation peroxysomale, ces deux phénomènes pouvant conduire à une accumulation d'AGTLC. Par ailleurs, sur des cellules gliales et des cellules neuronales (**Hein et al., 2008; Baarine et al., 2012; Zarrouk et al., 2012**), il a été rapporté que l'acide tétracosanoïque (C24:0) est capable de déclencher des dysfonctionnements mitochondriaux et un stress oxydant associé à un mode non-apoptotique de mort cellulaire. Ces événements sont considérés comme importants dans le développement de la MA (**Zarrouk A et al., 2015**).

Compte tenu de ces observations, il est important de préciser les effets du C24:0 sur différents types de cellules nerveuses.

Arguments en faveur de l'implication du potassium et des canaux potassium voltage dépendant (K_v) dans la MA

L'altération de l'homéostasie potassique a été décrite chez les patients Alzheimer au niveau central. Des variations des teneurs en K^+ ont été mesurées au niveau de l'hippocampe, du cortex et du cervelet des patients Alzheimer pendant les stades précoces de la maladie (**Vitvitsky et al., 2012 ; Graham et al., 2015 ; Roberts et al., 2016**) et des corrélations positives ont été détectées entre les charges en K^+ et en $A\beta$ au niveau de la région frontale (**Graham et al., 2015**). Cependant, les preuves réelles de l'altération de l'homéostasie potassique intracellulaire dans le processus de développement et de progression des maladies neurodégénératives sont limitées. Le dysfonctionnement de certains canaux potassiques pourrait expliquer la perte du contrôle de l'homéostasie potassique cérébrale. En effet, des

modulations de l'expression ou de l'activité de certains canaux K^+ ont été rapportées au niveau du système nerveux central et périphérique des patients Alzheimer.

Les canaux Kv4, Kv3.1/4, Kv2.1, Kv1.3/4/5, KCa2/3.1, KATP, BK et P2X7R ont été associés au développement de la MA (**Chung *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2001; Angulo *et al.*, 2004; Boda *et al.*, 2004; Hui *et al.*, 2008; Cotella *et al.*, 2012; Cotella *et al.*, 2014; Arnaiz *et al.*, 2014; Rangaraju, *et al.*, 2015; Ohnishi T *et al.*, 2015; Rangaraju *et al.*, 2015**). En se référant à la localisation du canal potassium voltage dépendant Kv3.1 au niveau des lésions cérébrales de patients MA, au rôle prépondérant de Kv3.1 dans la régulation du cycle de sommeil, des troubles psychiques et de certaines fonctions cognitives (**Espinosa *et al.*, 2001; Espinosa *et al.*, 2004; Joho *et al.*, 2006; Yanagi *et al.*, 2013**), une implication de Kv3.1 dans le développement de la MA a été suggérée.

Les travaux antérieurs concernant l'implication des lipides (oxystérols, AGTLC) dans la physiopathologie de la MA et l'altération de l'homéostasie potassique chez les patients MA, nous ont amené à préciser le lien qui pourrait exister entre ces deux acteurs. Ceci permettrait de préciser l'incidence de l'environnement lipidique sur la transmission de l'influx nerveux, mais aussi dans l'inflammation, faisant appel aux échanges de K^+ contrôlés entre autre par les canaux Kv dont Kv3.1 est un représentant.

Dans cette optique, les travaux présentés devraient conduire à une meilleure compréhension des relations entre le métabolisme lipidique (en particulier peroxysomal) et la régulation de l'homéostasie potassique dans la MA. Pour cela, mes travaux de Thèse sont subdivisés en trois parties:

- La première partie, réalisée *in vitro* sur différents types de cellules nerveuses (cellules oligodendrocytaires murines 158N et microgliales BV-2), est centrée sur l'étude de l'impact des oxystérols (7KC et 24S-OHC) et de l'AGTLC (C24:0) sur l'homéostasie potassique afin d'évaluer la contribution des canaux voltage dépendants dans le processus de lipotoxicité de ces composés. Nous avons aussi focalisé notre étude sur l'implication du canal potassium voltage dépendant Kv3.1 sur les cellules 158N et BV-2. L'impact des ses lipides cytotoxiques sur l'activité du canal Kv3.1 a aussi été étudié sur le modèle d'ovocyte de xénope par la technique de voltage clamp.
- La deuxième partie présente les résultats issus d'une étude clinique évaluant la relation entre le taux de potassium plasmatique et le métabolisme peroxysomal chez des patients Alzheimer tunisiens recrutés au service de Neurologie de l'Hôpital Fattouma

Bourguiba (Monastir, Tunisie).

- La troisième partie a été réalisée *in vivo* sur le modèle de souris transgéniques J20, développant une amyloïdogenèse, comparativement à des souris contrôles de même âge et de même fond génétique. L'objectif de cette partie a consisté à déterminer la topographie de Kv3.1 et d'Abcd3 au niveau du cortex, de l'hippocampe et du cervelet en recherchant d'éventuelles relations avec le métabolisme peroxysomal évalué par le niveau d'expression d'Abcd3 et des taux d'AGTLC au niveau périphérique (plasma, érythrocytes).

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Maladie d'Alzheimer

1. Vieillesse

1.1. Vieillesse de la population mondiale

Le vieillissement de la population est contrôlé par la baisse du taux de fécondité et l'augmentation de l'espérance de vie. La conjoncture démographique est aussi associée à d'autres approches historiques, géographiques, sociologiques, anthropologiques, économiques, épidémiologiques et biologiques. Les principales causes du décès sont le cancer, les maladies cardiaques et les maladies cérébrovasculaires, qui de nos jours sont détectées plus précocement et ainsi mieux traitées.

Le vieillissement de la population est dû à une amélioration globale de la qualité de vie et de la santé. Depuis les années 1950, le vieillissement démographique touche toute la planète.

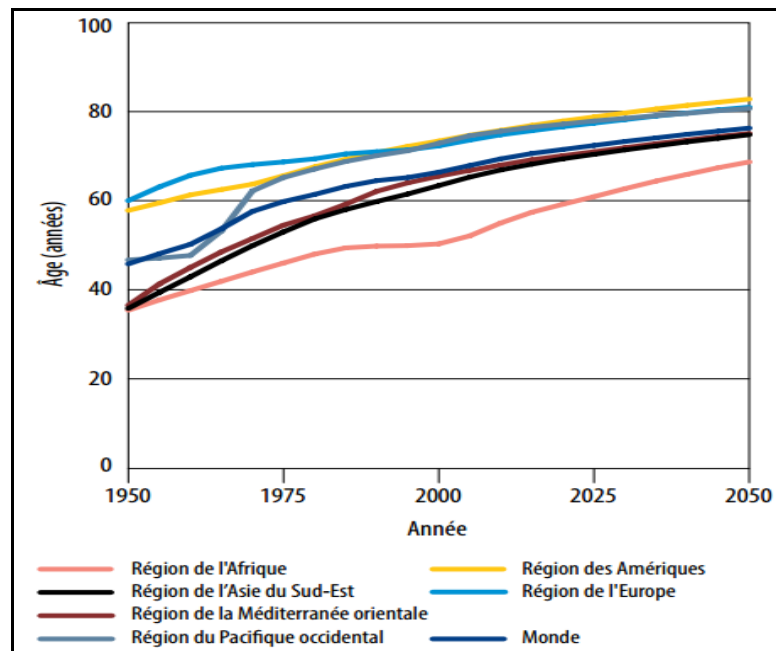


Figure 1: Évolutions de l'espérance de vie depuis 1950, avec projection jusqu'en 2050, par région de l'OMS et dans le monde

(http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/206556/1/9789240694842_fre.pdf?ua=1)

Dans les années à venir, le nombre de personnes âgées de 60 ans et plus sera plus important que celui des enfants de moins de 5 ans. En 1990, 26 pays avaient une population constituée de plus de deux millions de citoyens de 65 ans.

Le nombre de personnes âgées de 80 ans ou plus, aura été multiplié par quatre ou presque

entre 2000 et 2050. En l’an 2000, la proportion de la population mondiale de plus de 60 ans était estimée de 605 millions. Entre 2000 et 2050, la proportion de cette population passera à 22% par rapport à 8,5% actuellement (**Figure 2**).

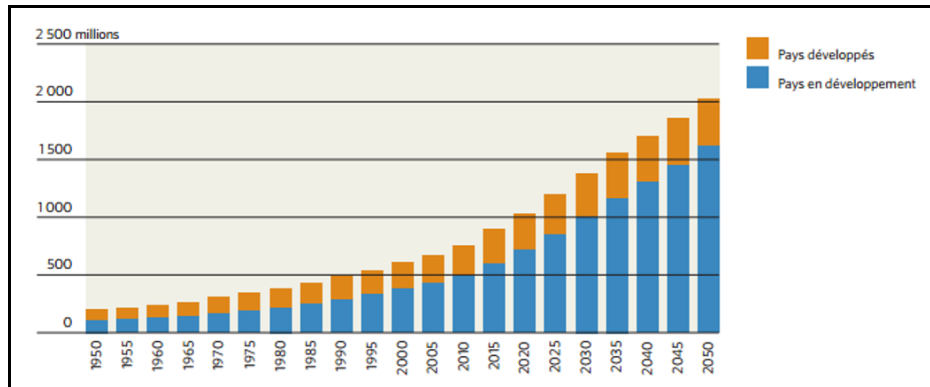


Figure 2: Évolutions de la proportion de la population âgée de 60 ans ou plus depuis 1950, projection jusqu’en 2050 (Département des affaires économiques et sociales (ONU) 2011).

1.2. Vieillesse et maladie d’Alzheimer

Actuellement, ce sont les pays les moins développés qui connaissent l’évolution démographique la plus spectaculaire, le rythme de croissance de leurs populations âgées est le plus élevé. Alors qu’il a fallu plus de 150 ans pour que la population française âgée de 65 ans et plus passe à 20 %, il ne faudra que quelques années à des pays tels que le Brésil et la Chine pour connaître la même croissance (**Figure 3**). La Tunisie a aussi connu un changement de son rythme de vie et le vieillissement s’est manifesté depuis les années 80 ; la proportion des personnes âgées de 60 ans et plus était de 9 % en 2000. Le doublement de cette proportion est prévu en 15 ans et devrait atteindre 18 % en 2029 (**Hajem et al., 2014**).

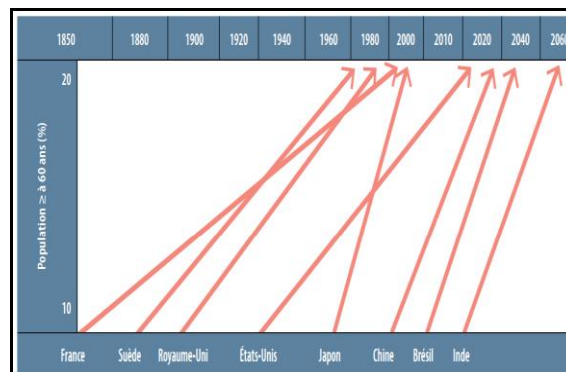


Figure 3: Période nécessaire ou estimée pour que le pourcentage de la population âgée de 60 ans et plus passe de 10 % à 20 %

Sur un plan biologique, le vieillissement peut être associé à l'accumulation d'une importante variété de modifications moléculaires et cellulaires qui affectent la capacité des personnes âgées à vivre normalement au sein d'une communauté (**Kirkwood, 2008; Steves et al., 2012**). Cela entraîne des conséquences qu'il faudra savoir gérer économiquement et socialement.

Le vieillissement est à l'origine de l'augmentation de la démence au niveau mondial. La démence est devenue un problème majeur de Santé Publique annoncé par le rapport *Dementia (A public health priority)* publié en 2012 (**Alzheimer's Disease International et Organisation mondiale de la Santé., 2012**). Cette pathologie hétérogène représente un défi important pour les sociétés vu leurs conséquences majeures en termes de dépendance et de coût. La démence touche dans le monde 47,5 millions de personnes avec 7,7 millions de nouveaux cas chaque année. Ce nombre devrait tripler d'ici 2050. La France pourrait actuellement compter près de 860 000 personnes âgées atteintes de démence et la Bourgogne en totaliserait 28 000 (**Publication réalisée par la Plate-forme de l'Observation sociale et sanitaire de Bourgogne David BRION, DRASS de Bourgogne, 2009**).

On distingue classiquement les démences d'origine dégénérative au premier rang desquelles se trouve la maladie d'Alzheimer (MA), près de 80 % des cas, la deuxième étiologie étant la démence vasculaire, les autres causes moins fréquentes sont la démence fronto-temporale et la démence à corps de Lewy (**Ramaroson et al., 2003**).

La MA, est la maladie neurodégénérative liée à l'âge la plus commune. Lors de la 37^{ème} conférence des psychiatres allemands à Tubingen, le psychiatre et microscopiste allemand, Alois Alzheimer, décrit pour la première fois le 4 novembre 1906, les symptômes particuliers de sa patiente, Auguste D, qui souffrait de troubles intellectuels graves et évolutifs : des pertes de mémoire, des difficultés à participer aux discussions, des problèmes de compréhension, allant jusqu'à l'aphasie, des comportements incohérents et imprévisibles, une incapacité à se concentrer, une désorientation, des hallucinations, puis une impossibilité de réaliser des actes de la vie quotidienne. Alzheimer pratiqua l'autopsie du cerveau et mit en évidence des lésions visibles de la structure du cerveau. Elles étaient de deux types : les plaques séniles, qui avaient déjà été observées par Oskar Fischer chez des patients âgés atteints de démence dite sénile (**Grosclaude et al., 1996**), d'où leur nom, et les dégénérescences neurofibrillaires. Cette particularité anatomopathologique, décrite pour la première fois par Alzheimer, en fera sa renommée. Le terme de « maladie d'Alzheimer » a été utilisé pour la première fois dans le traité de Psychiatrie, par le Professeur Emil Kraepelin.

La MA est une pathologie évolutive qui débute en générale par des troubles mnésiques épisodiques de la mémoire récente. Cette phase symptomatique légère à modérée, qui dure en moyen 3 à 4 ans, est précédée par une phase silencieuse asymptomatique qui peut s'étendre sur plusieurs années. Avec l'évolution de la maladie, ces troubles peuvent être suivis par des troubles des fonctions exécutives, ainsi que par des troubles de l'orientation dans le temps et dans l'espace. D'autres fonctions cognitives sont ensuite altérées avec des troubles de la parole (aphasie) et de l'écriture (dysorthographe), des troubles des gestes volontaires (apraxie) et troubles de la reconnaissance visuelle et auditive (agnosie). Des troubles psychocomportementaux surviennent également (dépression, irritabilité). Ces différents troubles conduisent à une perte d'autonomie des personnes atteintes de cette pathologie.

Une meilleure connaissance de l'épidémiologie de la MA est donc une nécessité pour mieux connaître sa physiopathologie, mettre en place des moyens de prévention et identifier des biomarqueurs ainsi que des cibles thérapeutiques qui permettront de traiter, voir de guérir, cette maladie neurodégénérative sévère.

2. Prévalence de la maladie d'Alzheimer

L'étude épidémiologique de la MA est une nécessité incontournable pour apprécier l'importance de la maladie et mettre en place des moyens de contrôle et qui nous permettent de préciser la prévalence, l'incidence et les facteurs de risque de la maladie.

L'incidence et la prévalence de la MA sont connues et de nombreux facteurs de risque ont été identifiés dont certains ouvrent des voies de recherche possibles aidant à la prévention de la maladie.

La prévalence de la MA, toutes causes confondues augmente exponentiellement entre 65 et 85 ans. Après 85 ans, cette augmentation est moins bien documentée, les sujets très âgés étant relativement peu nombreux dans la plupart des études et les difficultés diagnostiques plus importantes dans cette tranche d'âge. Dans certains travaux, l'augmentation de la prévalence des démences, après 85 ans, poursuit sa trajectoire exponentielle avec l'âge, tandis que dans d'autres la courbe de prévalence décrit un plateau.

La prévalence et l'incidence de la MA ont été étudiées en Europe. Les résultats de l'étude coopérative européenne réunit les données de 11 cohortes de sujets âgés de plus de 65 ans et utilise une méthodologie voisine à partir d'échantillons tirés au hasard dans la population. Dans cette étude, dont les résultats sont les plus crédibles actuellement, les critères NINCDS-ADRDA* de maladie d'Alzheimer ont été appliqués (McKhann *et al.*, 1984).

D'après ce travail, la prévalence de cette pathologie est de 4,4 % celle de la démence est de 6,6 %. Cette prévalence augmente avec l'âge : elle est de 0,6 % entre 65 et 69 ans et atteint 22,2 % après 90 ans. On observe une prévalence plus élevée chez les femmes que chez les hommes après 70 ans pour la MA. En France, le nombre de personnes atteintes par la MA a été estimé à 754 000 en 2010, si aucun progrès n'est fait dans la prévention de la maladie, une augmentation de ce nombre est attendue dans les prochaines décennies du fait du vieillissement de la population (**Mura et al., 2010**). La prévalence de la MA en Tunisie a été estimée de 3,2 %, au sein de la population tunisienne âgée de 65 ans et plus en 2012. En 2030, le nombre des personnes âgées de 65 ans et plus atteintes de la MA atteindrait près de 40 600 patients (**Hajem et al., 2014**).

La prévalence d'une maladie dépend à la fois de son incidence (nombre de nouveaux cas) et de la durée de la survie des patients (pour une maladie chronique). Il est donc indispensable, en particulier pour des pathologies chroniques comme les différents types de démences, d'estimer et de suivre l'incidence de la maladie pour évaluer sa progression en terme de nombre de cas. L'incidence de la MA a également été analysée, dans l'étude coopérative européenne, sur 8 cohortes de sujets de plus de 65 ans (**Fratiglioni et al., 2000**). L'incidence globale de la MA augmente avec l'âge. L'incidence de la MA est plus élevée chez les femmes après 75 ans. L'affirmation que le sexe est un facteur de risque pour la MA est très controversée et la majorité des épidémiologistes s'accordent sur le fait que ces données sont probablement liées aux différences d'espérance de vie et de pathologies associées dans les deux sexes.

3. Symptomatologie et évolution de la maladie d'Alzheimer

Les manifestations symptomatiques spécifiques aux maladies neurodégénératives incluent des troubles neurologiques, cognitifs et neuropsychiatrique (symptômes comportementaux et psychologiques de la démence) (**Finkel et al., 1996**). L'évolution de la maladie peut se décomposer schématiquement en trois phases (MA modérée, légère et sévère) précédées par une phase préclinique silencieuse asymptomatique (stade prodromal) qui peut s'étendre sur plusieurs années (**Figure 4**) (**Mayeux et al., 2010**).

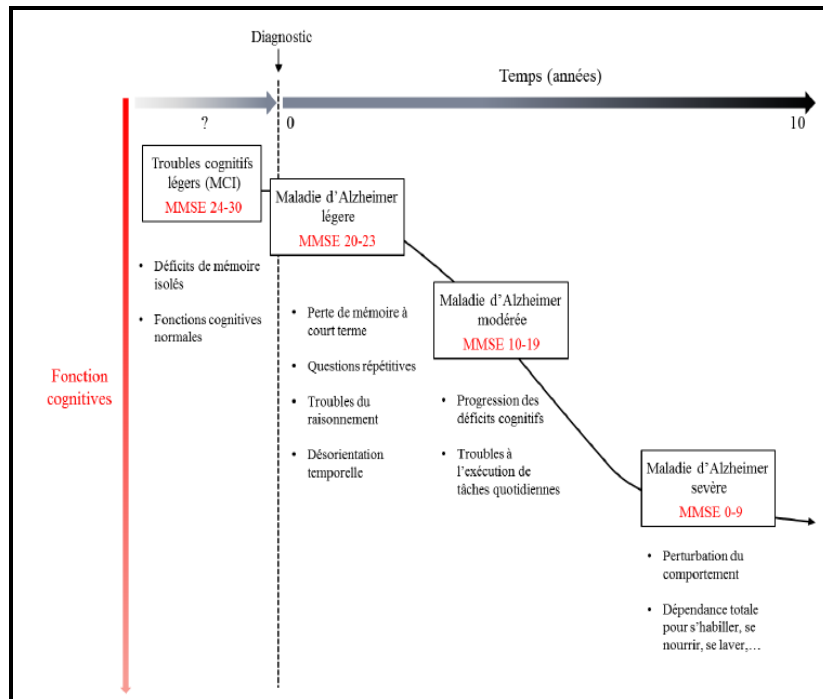


Figure 4: Progression clinique de la maladie d'Alzheimer.

MMSE = Mini-Mental Status Examination (Petrella *et al.*, 2003)

Durant cette phase préclinique, les patients se plaignent d'une diminution des fonctions cognitives et présentent des amnésies rétrogrades mineures (Grober *et al.*, 2008; Rabin *et al.*, 2009; Albert., 2011). Durant cette phase, les déficits ne sont pas assez importants pour être détectés par les tests standards comme le MMSE (Mini-Mental State Examination) (Folstein *et al.*, 1975).

Les cliniciens décrivent ensuite une phase de troubles cognitifs légers (MCI : Mild Cognitive Impairment). Ils peuvent aussi présenter des troubles non-cognitifs comme l'isolement social ou la dysphorie (Förstl *et al.*, 1999). La première fonction cognitive altérée est la mémoire, puis la gravité des symptômes augmente tout au long de la maladie et d'autres zones cognitives sont touchées : la mémoire à long terme, l'orientation spatiale et temporelle, le langage, les fonctions exécutives jusqu'à l'invalidité du patient. La mémoire de travail est la première forme de mémoire atteinte au cours de la MA avec une incapacité à retenir de nouvelles informations et leur exécution durant la réalisation d'une tâche (Morris *et al.*, 1988). Malheureusement, la moitié des personnes dont le diagnostic clinique MCI a été validé évolueraient vers la MA. Ces troubles sont décrits comme légers vu qu'ils n'interfèrent pas dans les activités de la vie quotidienne (Robert *et al.*, 2009). Théoriquement, la mémoire est multisystémique et la MA n'affecte pas tous les processus et systèmes de mémoire de manière égale (Figure 5).

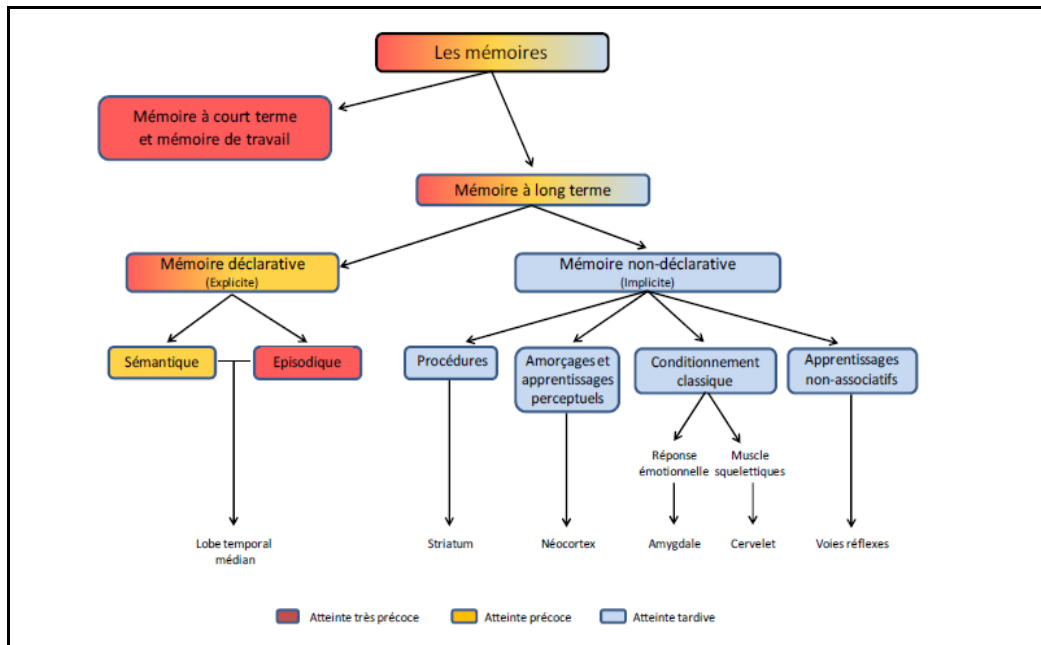


Figure 5: Représentation schématique des différents systèmes de mémoire atteints au cours de l'évolution de la maladie d'Alzheimer (Adaptée de Squire *et al.*, 1992)

La mémoire à court terme et la mémoire de travail sont les formes de mémoire les plus précocement atteintes dans la MA au même titre que la mémoire épisodique. En revanche, la mémoire non-déclarative ne sera affectée qu'à des stades avancés.

Le patient entre ensuite en phase clinique de la MA. Cette phase s'accompagne d'une progression de l'amnésie rétrograde. Les patients perdent contact avec leur présent et ne conservent que les souvenirs les plus anciens (Beatty *et al.*, 1988). Le patient éprouve des difficultés à reconnaître ses amis et sa famille. La perte du sens de l'orientation, de la situation dans le temps et l'espace conduit à une dépendance pour de nombreuses activités quotidiennes. Après, le déclin cognitif s'aggrave, le patient perd presque toutes ses facultés cognitives, les souvenirs les plus anciens disparaissent jusqu'à l'incapacité et le décès du patient. Il est important de noter que cette pathologie évolue de façon très différente d'un patient à un autre, mais le test MMSE (*Mini-Mental Status Examination*) apporte des éléments permettant de suivre son évolution pour chaque patient (Petersen *et al.*, 2001; Swerdlow *et al.*, 2007).

4. Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer

Les causes de la MA ne sont pas encore élucidées. Les difficultés dans la détection des cas de MA au stade précoce ont des conséquences directes sur l'étude des facteurs de risque spécifiques à cette maladie. En effet, comme le processus pathologique de la MA est installé

plusieurs années avant l'apparition des premiers signes cliniques, il est difficile de dater avec précision le début de la maladie. En conséquence, quand les épidémiologistes réalisent des études sur les facteurs de risque de la MA à partir des cas incidents repérés dans une cohorte, le groupe « normal » chez lequel le diagnostic de démence n'a pas été porté comprend nécessairement un nombre non négligeable de cas de malades à un stade préclinique.

Pour tenter d'expliquer l'apparition de la MA, une multitude de facteurs de risque a été liée au développement de la MA. Cette maladie est une pathologie multifactorielle complexe. Il semblerait qu'il n'existe pas un facteur causal déterminant mais plusieurs paramètres, rattachés au développement de la maladie (**Dartigues *et al.*, 2013**). Les perturbations du métabolisme lipidique sembleraient largement contribuer au développement de la MA. Les anomalies lipidiques telles que le polymorphisme de l'apolipoprotéine E, l'altération du métabolisme du cholestérol, la diminution du métabolisme lipidique peroxysomal ont été fortement suspectés (**Kölsch *et al.*, 1999; Vaya *et al.*, 2007; Seripa *et al.*, 2011; Leoni *et al.*, 2011; Lizard *et al.*, 2012**).

Deux formes de MA sont décrites : sporadique et familiale. La forme familiale est une forme héréditaire très rare (environ 5 % des cas décrits) pour laquelle des mutations dans certains gènes ont été identifiées. Pour la forme sporadique, les causes sont largement inconnues même si certains travaux font état d'une susceptibilité génétique. Certains facteurs comme l'âge, le sexe ou la génétique ne sont pas modulables. En revanche, nous pouvons agir sur les facteurs environnementaux.

4.1. Les facteurs de risque génétique

Antécédents familiaux et gènes de susceptibilité

Les patients ayant un parent atteint de la MA, présentent 3,5 fois plus de risques de développer la MA (**Green *et al.*, 2002**). Dans le cas où les deux parents sont atteints de la MA, le risque monte à 7,5. La transmission d'un gène de susceptibilité de la MA pourrait expliquer l'incidence de la forme sporadique tardive (survenant à un âge avancé). A eux seuls, ces gènes sont incapables de déclencher la maladie, mais leur association à des facteurs environnementaux augmentent la prévalence pour la maladie. Il existe plusieurs gènes de susceptibilité pour le développement de la MA dont le plus commun est l'allèle l'apolipoprotéine E 4 (ApoE4) situé sur le chromosome 19 (**Spinney, 2014**). Cette protéine est nécessaire pour le transport du cholestérol dans la circulation sanguine. Ce gène présente trois allèles appelés Epsilon 2, 3, et 4 qui codent pour trois formes différentes de protéine

astrocytaire (apoE2, apoE3 et apoE4). Les porteurs de l'allèle Epsilon 4 ont trois à douze fois plus de risque de développer la maladie (**Farrer et al., 1997**). Le produit de l'allèle 4 semble favoriser l'agrégation du peptide A β sous forme de plaques séniles. Il serait impliqué dans 40 % à 65 % des cas de MA (**Farrer et al., 1997**). Cet allèle n'est pas uniquement impliqué dans la MA mais dans d'autres maladies comme les démences vasculaires, la maladie de Creutzfeldt-Jacob autres démences et maladies cardiovasculaires (**Roses, 1995; Mahley et al., 2016**). Les mécanismes biologiques concernant le rôle de l'apoE sont multiples et restent pour la plupart mal compris.

La mutation R47H du récepteur TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) exprimé par la microglie a aussi été établie comme facteur de risque associé à la MA. La présence de cette mutation double le risque de prédisposition à la MA (**Benitez et al., 2013**).

Actuellement, 25 autres loci de susceptibilité ont été référencés confirmant les hypothèses connues (rôle de la voie amyloïde, de la protéine Tau, de la réponse immune et de l'inflammation, de la migration cellulaire, du transport lipidique et de l'endocytose) (**Van Cauwenberghe et al., 2015**)

Forme familiale : preuves génétiques

Trois mutations génétiques ont été identifiées pour la forme à début précoce (survenant avant 60 ans) : une mutation située sur le chromosome 21 codant pour le précurseur de la protéine amyloïde (APP), une deuxième sur le chromosome 14 codant pour la préséniline 1 et une troisième sur le chromosome 2 codant pour la préséniline 2 (**Brice et al., 2013**). Les mutations des gènes *PSEN1* (préséniline 1) et *PSEN2* (préséniline 2) orientent le clivage de l'APP dans le sens de la voie amyloïdogène. Par conséquent le taux des peptides A β 42 et A β 40 dans des échantillons plasmatiques et dans des fibroblastes de patients présentant de telles mutations ont révélé une augmentation sélective du taux de peptide A β 42. À ce jour, 142 mutations du gène *PSEN1* responsables d'environ 50 % des formes familiales de la MA ont été répertoriées, la plupart conduisant à des formes agressives, parfois déclarées chez des sujets de moins de 30 ans (**Bertram et al., 2004; Kowalska et al., 2004; Vetrivel et al., 2006**). Cependant, seules 10 mutations du gène *PSEN2* ont été identifiées (**Bertram et al., 2004; Kowalska et al., 2004**). Ces mutations observées sur l'un ou l'autre de ces trois gènes sont à transmission autosomique dominante (**Patry et al., 2006**).

Certains auteurs suggèrent aussi que la protéine Tau est nécessaire à la toxicité induite par le peptide A β fibrillaire. De plus les neurones dépourvus de la protéine Tau n'évoluent pas vers

la neurodégénérescence même en présence des taux élevés d'A β . De plus, il a été suggéré que l'interaction de la protéine GSK-3 β , kinase régulant la phosphorylation de Tau, avec la protéine PS1 n'est favorisée que par la présence de certaines mutations du gène *PSEN*. Ce complexe GSK-3 β -PS1 pourrait avoir pour substrat la protéine *Tau* et conduire aux formes familiales de la MA (Takashima *et al.*, 1998).

4.2. Les facteurs de risque environnementaux

L'âge est le premier facteur de risque de la MA. Cependant, cette pathologie est souvent associée à d'autres pathologies comme le diabète de type II, l'obésité, l'hypertension et l'inflammation chronique (Grundke *et al.*, 1986). Le niveau de vie et d'éducation, l'activité intellectuelle et la pratique d'activité de loisirs influent aussi sur le risque de développement de la MA. Par exemple, cette maladie est plus fréquente chez les personnes ayant des niveaux d'instruction ou d'activité intellectuelle faibles ou n'ayant pas d'activité sportive. La prévalence de la MA est plus élevée chez les femmes que chez les hommes (Mielke *et al.*, 2014). Ceci peut être expliqué par la variation des taux des hormones sexuelles avec l'âge chez la femme (Li *et al.*, 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. D'autres études incriminent certains métaux (aluminium, fer, mercure, ...), l'alcool, le tabac et le régime alimentaire (carences en vitamines en particulier Vitamine D et Vitamine E, régime trop riche en graisses, ...) (Dosunmu *et al.*, 2007).

5. Neuropathologie

5.1. Aspects morphologiques

Au niveau macroscopique, la plupart des examens post mortem du cerveau humain montre que le volume du cerveau diminue avec l'âge de façon relativement diffuse et uniforme dans la substance blanche mais présente des différences régionales dans la substance grise. Entre 30 et 50 ans le volume cérébral diminue de 0,1 - 0,2 % par an à 0,3 - 0,5 % après 70 ans, mais chez les patients atteints de MA, le cerveau peut perdre 8 à 10% de son volume (Esiri *et al.*, 2007).

Le système ventriculaire s'élargit en réponse à la perte de volume cérébral (Esiri *et al.*, 2007). En cas de MA, le cerveau des patients est atrophique et présente une hypertrophie ventriculaire avec un rétrécissement de ses circonvolutions (relativement variable, de presque normal à sévèrement atrophié). Plus que l'épaisseur du ruban cortical, c'est sa longueur qui est diminuée (Duyckaerts *et al.*, 1985). Il en résulte une perte de poids cérébral de 200 à 500

g. Les cerveaux de patients atteints de la maladie pèsent généralement moins de 1200 g, allant même jusqu'à peser 800 g pour certains (**Esiri et al., 1997**) (**Figure 6**).

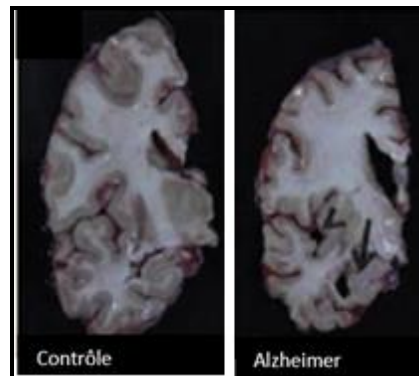


Figure 6: Caractéristiques anatomo-pathologiques de la maladie d'Alzheimer.

Les cerveaux de patients atteints de MA présentent une atrophie générale en particulier de l'hippocampe et un amincissement cortical (Flèches)

L'atrophie cérébrale est étendue, elle est majeure dans la région du lobe temporal et notamment au niveau de l'hippocampe, de l'amygdale et du cortex entorhinal, alors que le cortex moteur et sensoriel (parahippocampique, rétrosplénial, entorhinal et périrhinal) et le cervelet (régions pourtant très pauvres en plaques séniles) sont plus préservés de cette atrophie (**Serrano-Pozo et al., 2011**). Une hypothèse expliquant l'atrophie observée serait une perte neuronale mais surtout une perte synaptique (**Terry et al., 2000**). Les neurones cholinergiques semblent les neurones les plus vulnérables. Des altérations dans la transmission glutamatergique ont été également décrites. Les neurones sérotoninergiques et noradrénergiques afférents au cortex sont atteints de façon variable (**Cacabelos et al., 1999**).

5.2. Aspects microscopiques

Aloïs Alzheimer rapporta, pour la première fois, les caractéristiques histopathologiques de la nouvelle maladie d'une femme de 51 ans, Auguste D., souffrant « d'un délire de jalousie suivi d'une désintégration des fonctions intellectuelles ». L'examen microscopique du cortex cérébral de la patiente, observé après imprégnation argentique, révèle la présence de lésions associées à des dégénérescences neurofibrillaires (DNF), caractérisées par des amas anormaux de fibrilles dans les neurones. Ces résultats ont été publiés en 1907 « Une maladie inhabituelle du cortex cérébral ». Cette découverte histopathologique a été détaillée de plus en 1909 par Perusini en décrivant les plaques amyloïdes et les DNF dans son article « Résultats

histopathologiques et cliniques de quelques maladies psychiatriques de la personne âgée ».

De nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension des dysfonctionnements cognitifs et de la neuropsychologie observés dans la MA. Par ailleurs, sur le plan neuropathologique, la MA est caractérisée par la présence de deux types de lésions dans les régions hippocampiques et corticales associatives, à savoir les plaques séniles et les DNF (Figure 7) (Dickson *et al.*, 1997; Braak *et al.*, 1998).

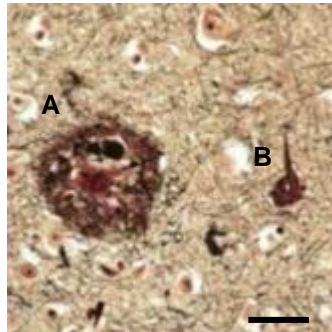


Figure 7: Photomicrographie de lésions pathologiques du cortex frontal de patient atteint de la Maladie d'Alzheimer présentant à la fois la présence de plaques amyloïdes(A) et de dégénérescence neurofibrillaire (B), visualisées à l'aide d'une coloration à l'argent (Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

5.2.1. La dégénérescence neurofibrillaire

L'étude de la structure des DNF à l'aide d'outils immunologiques permet de mettre en évidence la présence des paires de filaments en hélice constituées de vimentine (Yen *et al.*, 1983), de protéine d'association aux microtubules (MAP2) et de protéine Tau sous forme hyperphosphorylée (Brion *et al.*, 1985; Delacourte *et al.*, 1986; Grundke-Iqbal *et al.*, 1989). Le séquençage de protéines extraites du cœur des DNF a abouti à l'identification d'ADNc codant pour la protéine Tau apportant une preuve que Tau est le composé majoritaire de DNF (Goedert *et al.*, 1989).

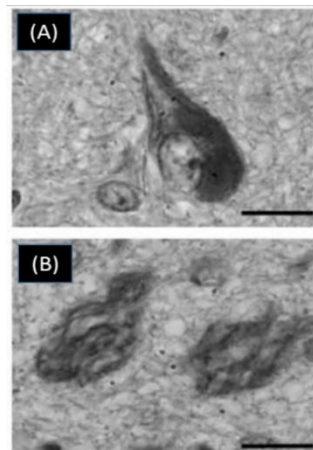


Figure 8 : Dégénérescence neurofibrillaire (Basurto *et al.*, 2008)

DNF intracellulaires (A) et extracellulaires (B) de la région hippocampique CA1 (Corne d'Ammon) de cerveau de patient Alzheimer marqués avec l'anticorps MN423. Echelle (A et B) : 10 μ m

Chez l'homme, la protéine Tau (Tubulin Associated Unit) est principalement exprimée dans les neurones (**Kempf *et al.*, 1996**). C'est une protéine cytosolique thermostable responsable de l'assemblage et de la stabilisation des microtubules (**Weingarten *et al.*, 1975; Cleveland *et al.*, 1977**). Tau pourrait également moduler le transport des vésicules le long de l'axone par interaction avec des protéines telles que la kinésine (**Kempf *et al.*, 1996**). Tau pourrait aussi avoir un rôle clef dans la maturation neuronale et plus particulièrement dans le processus de polarisation lors duquel se forment l'axone et le corps somatodendritique (**Dotti *et al.*, 1988**). Dans son état natif, Tau est une protéine comprenant entre 352 et 441 acides aminés (de masse 55 à 62 kDa) et existe sous six isoformes produites à partir d'un gène unique situé sur le chromosome 17. Des mutations génétiques sur ce chromosome conduisent à la démence fronto-temporale avec Parkinsonisme. Au moins 14 mutations géniques ont été identifiées et pourraient conduire au concept de tauopathie qui désigne l'ensemble des maladies ayant pour base la présence dans les neurones d'agrégats de protéines Tau anormalement phosphorylées, ou une perturbation de l'expression de cette protéine (**Delacourte *et al.*, 2005**). Aucune mutation de la protéine Tau conduisant à la MA n'a été répertoriée (**LaFerla *et al.*, 2005**). Récemment, Piccoli *et al.* ont analysé par NGS (Next-Generation Sequencing) l'expression de dix gènes associés à la démence. Cette étude a identifié un polymorphisme bénin de deux variantes de protéine Tau qui ne montre aucune contribution au développement de la MA. Cette protéine a la particularité de posséder dans sa séquence trois à quatre répétitions d'un même domaine de 18 acides aminés chacun permettant la liaison aux microtubules (**Sergeant**

et al., 2008). Cette liaison est par ailleurs fortement régulée par la phosphorylation de la protéine au niveau de résidus sérine, thréonine ou tyrosine (**Buee *et al.*, 2000; Sergeant *et al.*, 2008**). Lors d'un phénomène neurodégénératif, Tau subit une hyperphosphorylation et ce qui a pour conséquence une diminution de son affinité pour les microtubules. Ainsi, le pool de protéines Tau capables de se lier aux microtubules et donc d'en promouvoir la polymérisation est significativement réduit chez les patients atteints de la MA (**Lindwall *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1988; Bramblett *et al.*, 1992**) ce qui a d'importantes répercussions sur le transport axonal et contribue à l'altération de la plasticité synaptique et au processus neurodégénératif (**Arendt *et al.*, 2004**). Par ailleurs, l'accumulation et l'agrégation des protéines Tau anormalement phosphorylées induisent le recrutement des protéines MAP1 et MAP2 (**Alonso *et al.*, 1994; Alonso *et al.*, 1997**) amplifiant la déstabilisation des microtubules. De plus, la protéine Tau hyperphosphorylée est aussi plus sensible aux modifications chimiques induites par le stress oxydant et subit des changements conformationnels suite à ces oxydations. Elle s'agrège alors selon un processus de polymérisation (**Barghorn *et al.*, 2002**) sous forme de paires hélicoïdales de filaments (PHFs: "paired helical filaments"). Ces derniers s'associent ensuite en structures plus grandes : les neurofibrilles. Par ailleurs, il est suggéré que les ions Al III et Fe III, liés à Tau dans des cerveaux de patients lors d'études *post mortem*, contribuent à la polymérisation de Tau hyperphosphorylée (**Smith *et al.*, 1997; Sayre *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2003**).

Il est important de noter que les agrégats intracellulaires de protéines Tau ne sont pas spécifique à la MA ; ils sont présents dans de multiples pathologies neurodégénératives : trisomie 21, nombreux syndromes parkinsoniens (dégénérescence cortico-basale, paralysie supranucléaire progressive, maladie de Parkinson post-encéphalitique, syndrome de l'île de Guam, certaines démences fronto-temporales (DFT) telles que la maladie de Pick, démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17 (DFTP-17), dystrophie myotonique comme la maladie de Steinert, etc. (**Lee *et al.*, 2004**).

5.2.2. Les plaques amyloïdes

Trois types de dépôts amyloïdes extracellulaires sont retrouvés de façon récurrente dans le cerveau de patients décédés de la MA : les plaques diffuses, les dépôts cérébrovasculaires amyloïdes (AAC : angiopathies amyloïdes cérébrales) et les plaques séniles (**Morgan *et al.*, 2004**). Les plaques diffuses, non structurées en feuillet β , sont fréquemment présentes chez les personnes âgées ne présentant pas d'altération cognitive ou intellectuelle. La présence de ces lésions n'est donc pas associée à la MA. Elles ne sont également pas entourées de neurites

dystrophiques. En effet, de nombreuses personnes âgées n'ayant pas de déficit cognitif présentent une charge amyloïde cérébrale importante (Serrano-Pozo *et al.*, 2011) et par conséquent la simple présence de ces lésions ne permet pas d'asseoir le diagnostic de MA (Nicoll *et al.*, 2004). Les AAC consistent en un dépôt de peptide A β dans et autour des vaisseaux sanguins associés aux plaques (les vaisseaux du cortex cérébral et des méninges). La cascade conduisant au processus neurodégénératif est liée à une perte d'efficacité dans le processus d'élimination du peptide A β par voie sanguine. Cette perte d'efficacité du mécanisme de clairance conduirait à l'augmentation globale du niveau de peptide A β dans le cerveau. Les AAC sont fortement corrélés avec la MA, puisque 87% des patients atteints de la MA présentent des AAC, contre seulement 35% des patients âgés sains (Glenner *et al.*, 1981; Yamada *et al.*, 2004). Contrairement aux plaques diffuses, les plaques séniles, également appelées plaques focales ou plaques neuritiques, sont souvent retrouvées chez des patients souffrants de MA. Elles sont organisées en feuillets β et associées à des effets délétères sur le neuropile environnant comprenant : une courbure des neurites, des neurites dystrophiques, une perte synaptique, une perte neuronale, un recrutement et une activation des cellules astrocytaires et microgliales (Figure 9) (Itagaki *et al.*, 1989; Masliah *et al.*, 1990; Knowles *et al.*, 1999; Urbanc *et al.*, 2002). Il est important de noter que des agrégats de type amyloïde impliquant d'autres protéines se retrouvent également dans des maladies aussi différentes que le diabète de type 2, la maladie de Huntington ou les maladies liées aux prions.

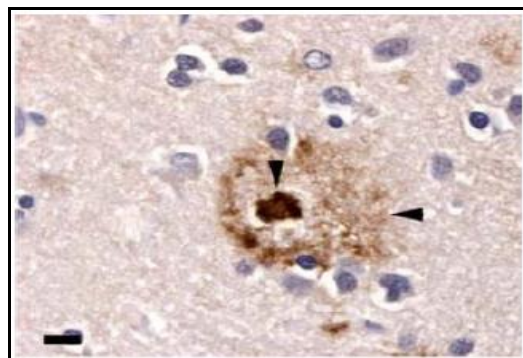


Figure 9: Immunomarquage des plaques amyloïdes en utilisant un anticorps anti-A β
(Duyckaerts *et al.*, 2009)

*Le dépôt amyloïde est entouré d'une couronne légèrement marquée de peptides A β (flèche).
Echelle : 10 μ m*

Le peptide amyloïde (A β) est le composant principal de ces différentes lésions extra cellulaires. Il est principalement produit au niveau des synapses suite au clivage protéolytique

Le peptide amyloïde ($A\beta$) est le composant principal de ces différentes lésions extracellulaires. Il est principalement produit au niveau des synapses suite au clivage protéolytique.

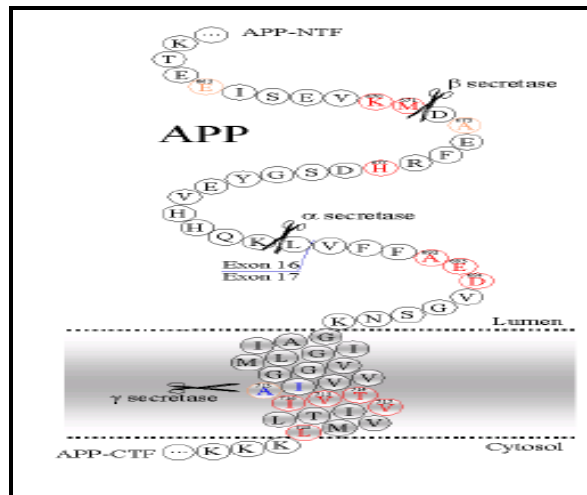


Figure 10 : Représentation schématique de l'APP (Amyloïd Precursor Protein)
(Jordan *et al.*, 2013)

L'APP peut-être clivée selon deux voies biologiques différentes : la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique (Selkoe *et al.*, 2001). Ces deux voies se différencient par les enzymes de clivage et leurs métabolites (fragments) produits. La voie amyloïdogénique, pathologique, qui conduit à la production de l' $A\beta$, nécessite le clivage successif de l'APP par la β -sécrétase et par la γ -sécrétase pour libérer principalement le peptide $A\beta$ constitué de 40 acides aminés ($A\beta_{1-40}$). Cependant, d'autres formes plus courtes ou plus longues sont également produites (entre 39 et 43 acides aminés), en particulier la forme $A\beta_{1-42}$, qui représente environ 10 % des espèces d' $A\beta$. De façon alternative le clivage de l'APP peut se faire physiologiquement, voie non-amyloïdogénique, par la α -sécrétase dans la séquence de l' $A\beta$ empêchant la production de ce dernier et en second lieu par la γ -sécrétase (Figure 11).

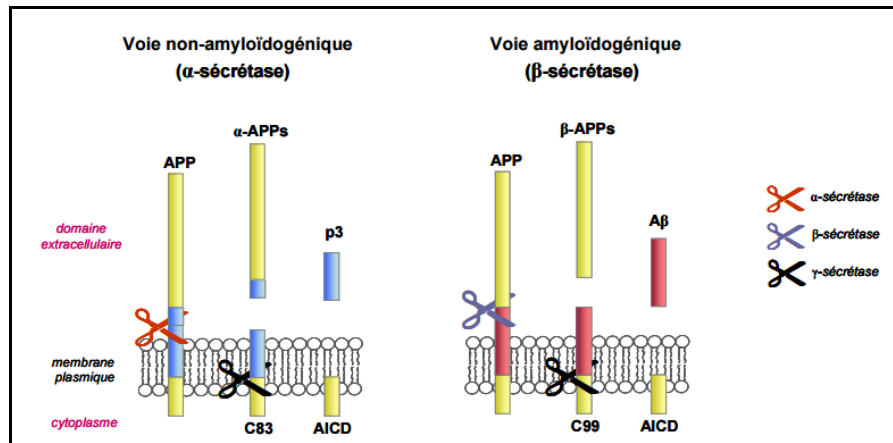


Figure 11: Clivage de l'APP et génération des peptides A β (Citron *et al.*, 2004)

Les peptides A β ont une tendance naturelle à agréger. Le peptide A β_{1-42} est plus hydrophobe que ses analogues plus courts. Sa solubilité est par conséquent plus faible et sa capacité à s'agréger très forte (environ 70 fois plus rapide que A β_{1-40}) (Serrano *et al.*, 2011). Dans le cas de la MA, le ratio A β_{1-42} /A β_{1-40} est déplacé en faveur du peptide A β_{1-42} et la balance entre les voies non-amyloïdogénique et amyloïdogénique est déplacée en faveur de la production d'A β . En plus de sa surproduction lors de la MA, sa clairance est diminuée (Buxbaum *et al.*, 1998; Colciaghi *et al.*, 2002; Mawuenyega *et al.*, 2010; Soldano *et al.*, 2014). C'est ainsi que l'A β_{1-42} , considéré comme le plus neurotoxique, est majoritaire au sein des plaques séniles détectées lors d'examen post mortem chez les patients MA dans les régions limbiques du cerveau telles que l'hippocampe et le complexe amygdalien ainsi que dans des régions corticales et subcorticales spécifiques (Iwatsubo *et al.*, 1994). Les plaques séniles sont présentes sous la forme d'agrégats sphériques denses de 50-200 μm de diamètre et de densité variable (Selkoe *et al.*, 2001). Ces lésions extracellulaires résultent de l'accumulation d'A β_{1-40} et A β_{1-42} assemblés en fibrilles agrégés en son centre et de prolongements neuritiques (issus principalement des neurones) chargés en protéines Tau en périphérie en présence d'autres éléments parmi lesquelles figurent des phospholipides, des ARN, des protéases, des facteurs du complément, des apolipoprotéines E et J et des métaux (Zn^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{2+}) (Morgan *et al.*, 2004).

Bien que les plaques séniles soient associées au processus de neurodégénérescence, les formes responsables de la toxicité sont toujours discutées (oligomérique ou fibrillaire, extracellulaire ou intracellulaire) (Mandybur *et al.*, 1990; Klein *et al.*, 2001; Hardy *et al.*, 2002). De nombreuses études montrent que les formes oligomériques solubles intermédiaires coïncidaient avec la perte synaptique et la sévérité des atteintes cognitives (McLean *et al.*,

1999; Hoshino *et al.*, 2003; Haass *et al.*, 2007). Par exemple, chez les souris transgéniques, les peptides A β peuvent commencer à exercer leur toxicité avant même la formation de plaques (Mucke *et al.*, 2000). De plus, de petits oligomères globulaires (des trimères aux 24-mères) de A β ₁₋₄₂ solubles et les protofibrilles, également solubles, sont proposés comme d'autres formes d'agrégation de A β pouvant générer de la toxicité, notamment en inhibant *in vivo* la plasticité synaptique et le mécanisme de potentialisation à long terme associé à la mémoire (Walsh *et al.*, 1997; Lambert *et al.*, 1998; Gong *et al.*, 2003). Bien qu'il soit bien admis la toxicité d'A β est associée à la forme A β ₁₋₄₂, la forme A β ₁₋₄₀ présente aussi des effets cytotoxiques (Zarrouk *et al.*, 2015). Par ailleurs, des études plus récentes basées sur des modèles expérimentaux ont montré qu'une accumulation intraneuronales d'A β , événement antérieur à l'agrégation d'A β , est également neurotoxique et responsable de dysfonctionnements synaptiques (Mucke *et al.*, 2000; Oddo *et al.*, 2003).

5.2.3. Autres lésions microscopiques associées à la maladie d'Alzheimer

Les corps de Lewy

50 à 60% des cas de MA présentent, en plus de plaques séniles et de DNF, des corps de Lewy résultant d'une agrégation anormale de la protéine α -synucléine (Hamilton *et al.*, 2000; Marsh *et al.*, 2012). Ces patients présentent un déclin cognitif plus rapide et plus sévère, ainsi qu'une espérance de vie réduite comparés à ceux ne présentant pas de corps de Lewy (Hansen *et al.*, 1990; Kraybill *et al.*, 2005). Des études ont également rapporté que des souris surexprimant les protéines humaines APP, Tau et α -synucléine présentaient des altérations cognitives plus rapides et sévères que des souris surexprimant uniquement Tau, APP, ou α -synucléine ou surexprimant Tau et APP. Ces observations suggèrent qu'il existe une potentialisation mutuelle de ces trois molécules sur la détérioration des fonctions mnésiques (Clinton *et al.*, 2010).

L'inflammation cérébrale

Des analyses histologiques ont démontré que des microglies activées et des astrocytes (Sofroniew *et al.*, 2010) sont retrouvés aux abords des plaques séniles (Sastre *et al.*, 2008; Mandrekar *et al.*, 2011). Des niveaux de médiateurs inflammatoires supérieurs à ceux de contrôles du même âge ont été observés dans le cerveau et le sérum de patients atteints de MA (Zhu *et al.*, 1999). La neuroinflammation est une caractéristique importante dans de nombreuses pathologies neurologiques autre que la MA dont la sclérose en plaques, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson (Wyss *et al.*, 2012), et la MA

(Mandrekar *et al.*, 2011). L'implication des astrocytes et des microglies dans le processus inflammatoire ainsi que leur contribution à la perte neuronale est détaillées dans le paragraphe 7.

Les pertes synaptiques

Le neuropile est constitué par l'ensemble des connexions dendritiques, synaptiques et axonales des neurones. L'arborisation dendritique couvre à elle seule 9% de la surface synaptique réceptrice neuronale. Dans la MA, le neuropile, et tout particulièrement l'arborisation dendritique, subit des modifications régressives (diminution de la longueur des dendrites et pertes des synapses) dans certaines régions comme le néocortex, l'hippocampe ou le subiculum. Le nombre de synapses par neurone peut diminuer de moitié dans les tissus *post-mortem* des patients atteints de la MA. Ces déficits synaptiques sont fortement liés au déclin des fonctions cognitives (Gomez *et al.*, 1997).

5.2.4. Localisation des lésions

Il n'existe pas de superposition exacte des lésions représentées par les dépôts amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire.

Les dépôts amyloïdes

Même pendant les premiers stades de la maladie, les dépôts amyloïdes sont diffus et peuvent être présents dans toutes les régions corticales. Les premiers dépôts de l'A β sont observés au niveau des régions néo-corticales, pour se poursuivre dans l'ensemble du cortex, puis dans les noyaux gris centraux et enfin dans le cervelet (Thal *et al.*, 2002).

Il existe des cas où il n'y a pas de dégénérescence neurofibrillaire dans le cerveau alors qu'il existe des dépôts amyloïdes. Ce serait un argument pour penser que les dépôts amyloïdes sont à l'origine des autres lésions constatées dans la MA. Il faut tout de même retenir que la situation inverse existe avec notamment une dégénérescence neurofibrillaire sans dépôt amyloïde.

Progression dans l'espace des lésions de dégénérescence neurofibrillaire

L'apparition de la dégénérescence neurofibrillaire suit l'évolution de la MA et évolue de manière stéréotypée et hiérarchisée (Braak *et al.*, 1991). Selon l'échelle de Braak & Braak, six étapes neuropathologiques ont été distinguées pour déterminer la progression de la MA (Braak *et al.*, 1991). Les premières lésions apparaissent dans les cortex périrhinal et entorhinal (Stages I-II) puis s'étendent progressivement

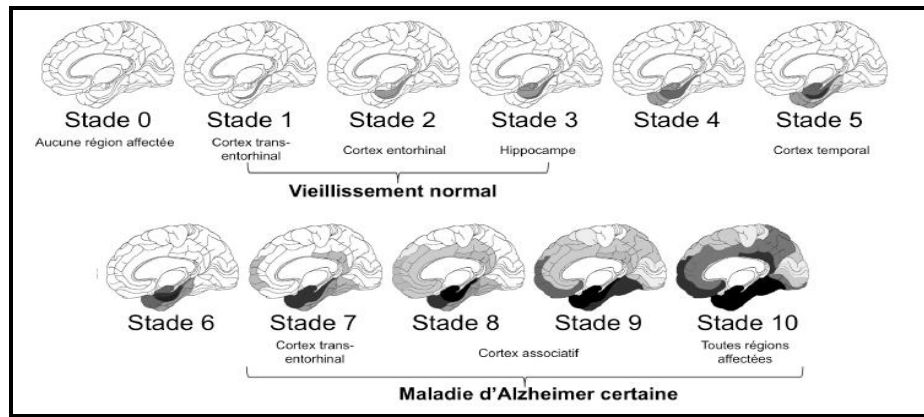


Figure 12: Evolution stéréotypée de la pathologie Tau

(Adapté de Delacourte *et al.*, 1999).

Au cours de la MA la taupathie commence par la région hippocampique puis s'étend à l'ensemble des régions corticales.

Les éléments qui déterminent la séquence des lésions ne sont pas connus. Actuellement, l'hypothèse la plus solide est celle qui met en cause les connexions inter-neuronales. En effet, les régions corticales atteintes de dégénérescence neurofibrillaire paraissent toutes innervées par des efférences provenant de noyaux gris centraux, eux-mêmes siège de lésions neurofibrillaires (De Lacoste *et al.*, 1993).

6. Acteurs cellulaires au niveau du système nerveux central

Le SNC est constitué de deux ensembles principaux de cellules : les neurones et les cellules gliales. Chez l'homme, les cellules gliales sont environ 5 fois plus nombreuses que les neurones et occupent environ la moitié du volume du cerveau.

Le terme « glie » a été introduit en 1858 par Rudolf Ludwig Karl Virchow, pour qui ces cellules étaient un tissu conjonctif dépourvu d'éléments cellulaires (Virchow *et al.*, 1858). La diversité des cellules gliales a été ensuite mise en évidence par Camillo Golgi et Santiago Ramon, ainsi ces cellules sont subdivisées en trois types cellulaires principaux : oligodendrocytes, astrocytes et cellules microgliales. Les cellules épendymaires, présentes au niveau des ventricules et responsables de la production et de la circulation du liquide céphalo-rachidien, sont également considérées comme des cellules gliales. En raison de leur incapacité à émettre des potentiels d'action, les cellules gliales ont longtemps été considérées comme de simples cellules de soutien ou cellules « nourricières » des neurones. Cette notion de cellules « passives » est aujourd'hui obsolète. Depuis quelques décennies, un nombre croissant d'études ont prouvé que les cellules gliales sont activées par d'autres stimulus autre que

l'excitabilité électrique. En effet, elles assurent un soutien structural et métabolique aux neurones et interviennent dans l'émission et la conduction des signaux nerveux.

6.1. Les astrocytes

6.1.1. Caractéristiques membranaires et électrophysiologiques des astrocytes

Les astrocytes sont les cellules majoritaires du système nerveux central. Elles doivent leur nom à Michael Von Lenhossek, en raison de leur morphologie étoilée. Il existe deux différents types d'astrocytes, les astrocytes protoplasmiques dans la substance grise et les astrocytes fibreux dans la substance blanche. Chaque astrocyte occupe un microdomaine spécifique, où l'arborisation d'une cellule ne se superpose pas avec l'arborisation de la cellule voisine (**Bushong et al., 2002**). Les astrocytes possèdent un corps cellulaire arrondi et de fines ramifications qui s'étendent sur 200 µm chez l'homme (**Oberheim et al., 2006**) et qui sont en contact avec les vaisseaux sanguins et les synapses. Le prolongement d'un seul astrocyte est capable de contacter plusieurs synapses (au niveau de l'hippocampe, il a été décrit qu'un même astrocyte pouvait contacter plus de 140 000 synapses) (**Bushong et al., 2002**).

Les astrocytes se distinguent des autres cellules gliales par leurs propriétés électrophysiologiques. Ils se caractérisent par un potentiel membranaire très négatif (entre -80 et -90 mV), une résistance d'entrée faible (environ 50 MΩ) et une relation courant/potentiel linéaire (**Barres et al., 1991; Bordey et al., 2000; Oberheim et al., 2012**). La forte densité des canaux potassiques pourrait expliquer le potentiel membranaire négatif de ces cellules (**Barres et al., 1991; Verkhratsky et al., 2000**). Outre l'expression de canaux potassiques, les astrocytes expriment également des canaux calciques, sodiques et potassiques dépendants du voltage, des canaux potassiques activés par le calcium (Ca²⁺) ou encore des canaux chlorures. La distribution des principaux ions de part et d'autre de la membrane plasmique astrocytaire est similaire à celle des neurones, hormis pour l'ion chlorure (Cl⁻) où le gradient est inversé (**Kettenmann et al., 1985**). Les astrocytes, tout comme les neurones, expriment également tous les récepteurs aux neurotransmetteurs et neuromodulateurs (**Porter et al., 1997; Verkhratsky et al., 1998; Verkhratsky et al., 2007**). Ces caractéristiques leur permettent d'assurer des fonctions aussi diverses qu'essentiels.

En conditions basales, les astrocytes sont responsables du maintien de l'homéostasie ionique, l'apport énergétique, la synaptogenèse et la transmission neuronale ou la plasticité synaptique (**Verkhratsky et al., 2007**). En effet, les astrocytes servent de « support métabolique » aux neurones via le cycle du lactate. Après recapture du glucose transporté par le biais de

transporteurs du glucose (GLUT) exprimés par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, celui-ci est transformé en pyruvate puis en lactate, grâce à la glycolyse. Le lactate est alors transféré dans l'élément neuronal, où il entrera dans le cycle tricarboxylique afin de fournir de l'ATP (Adénosine tri-phosphate), principal substrat énergétique impliqué dans les fonctions neuronales (**Tsacopoulos et al., 1996; Pellerin, 2010**). Ces besoins énergétiques sont contrôlés par les astrocytes. Les pieds astrocytaires (ou périvasculaires) sont capables de libérer des substances vasoactives, contrôlant ainsi le débit sanguin cérébral de manière locale (**Zonta et al., 2003; Magistretti et al., 2006; Petzold et al., 2011**). Outre la régulation du métabolisme énergétique, les astrocytes sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie ionique via leurs transporteurs et canaux ioniques (**Simard et al., 2004**). Le K^+ est particulièrement concerné car sa concentration extracellulaire peut doubler localement lors d'une transmission synaptique. Les astrocytes sont capables de réguler cette concentration par un stockage transitoire en attendant la diminution de la concentration potassique extracellulaire. Ce mécanisme est qualifié de « transient storage ». Lorsque ce mécanisme est saturé, le « spatial buffering » intervient à son tour par recapture du potassium puis par diffusion dans tout le réseau astrocytaire (**Walz et al., 2000**). Par ailleurs, les astrocytes régulent l'homéostasie d'eau entre le sang et le parenchyme cérébral. Les pieds astrocytaires expriment également les aquaporines 4 et des récepteurs aux neuropeptides (l'atriopéptine, l'angiotensinogène ou la vasopressine), impliqués dans le contrôle de l'homéostasie de l'eau (**Simard et al., 2004**). De plus, les neurones en culture possèdent une faible activité synaptique en l'absence d'astrocyte (**Berthet et al., 2009**). Ces derniers régulent la concentration en neurotransmetteurs dans la fente synaptique grâce à l'expression de transporteurs de différents neurotransmetteurs comme les transporteurs du GABA (**Eulenburg et al., 2010**), du Glutamate (**Tsacopoulos et al., 1996**), de la glycine, des monoamines (dopamine, norépinephrine et sérotonine) (**Eulenburg et al., 2010**) ou grâce à la libération des gliotransmetteurs comme le glutamate (**Parpura et al., 1994**), l'ATP (**Wang et al., 2000**), la D-sérine (**Figure 13**) (**Mothet et al., 2000**) et le GABA (**Angulo et al., 2008; Heja et al., 2009; Lee et al., 2010**).

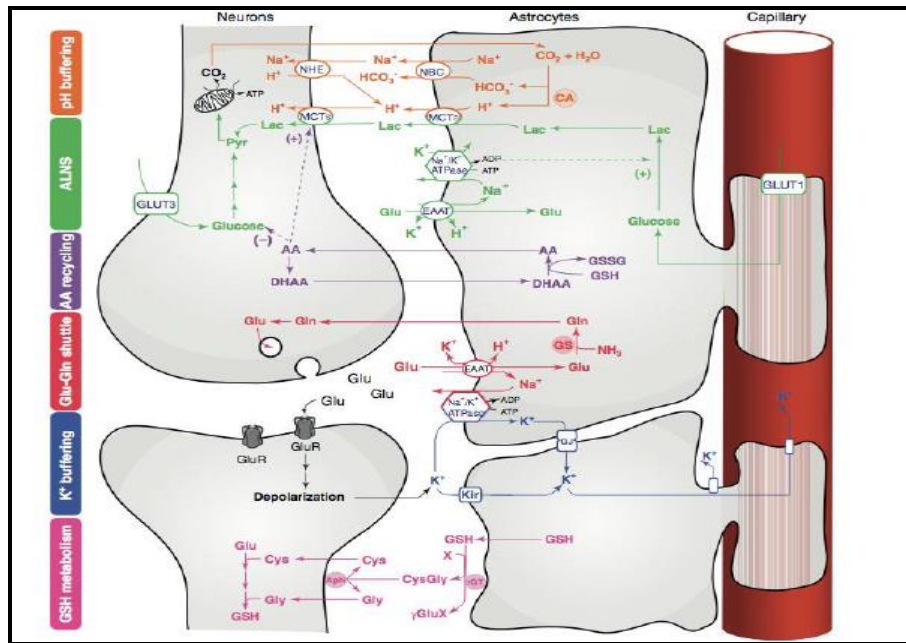


Figure 13: Couplage métabolique astrocyte-neurone (Allaman *et al.*, 2011)

Les astrocytes participent à la régulation de l'homéostasie ionique et au tamponnage du pH par l'activité Anhydrase carbonide qui décompose le CO_2 en HCO_3^- et H^+ . Les ions sont transportés dans le milieu extracellulaire par le co-transporteur (NBC) $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$ (voie orange). La libération de glutamate dans la fente synaptique, déclenche une activité synaptique accompagnée d'une libération du K^+ et capture de Na^+ et H^+ (voies rouge et vert). Le transport électrogène de Na^+ par la Na^+ / K^+ ATPase augmente les niveaux d'ADP et de Pi et stimule l'absorption du glucose par les vaisseaux sanguins (voie verte). Le glucose est transporté dans le milieu intracellulaire grâce aux transporteurs GLUT3 dans les neurones et GLUT1 dans les astrocytes. Le glucose entre alors dans le cycle de la glycolyse. Au niveau de l'astrocyte la glycolyse permet de libérer du lactate dans le milieu extracellulaire (via l'action des transporteurs MCT1 et 4). Le lactate est recapté par le neurone via l'action des transporteurs MCT2 et utilisé comme substrat énergétique pour produire de l'ATP à travers le cycle TCA (Voie verte). Les astrocytes absorbent l'excès de K^+ libéré pendant la transmission synaptique par des canaux à rectification entrante (Kir). Le K^+ diffuse dans les jonctions lacunaires astrogliales ou est libéré dans le capillaire sanguin (voie bleue). Les astrocytes contrôlent l'équilibre d'oxydoréduction par la production des molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique (AA) (voie violette) et glutathione (GSH) (voie rose) (Allaman *et al.*, 2011).

6.1.2. Contribution des astrocytes dans la Maladie d'Alzheimer

En cas d'atteintes cérébrales (stress oxydatif, infection, ischémie, neuroinflammation...), les neurones ont des capacités antioxydantes faibles, elles sont particulièrement sensibles au stress oxydatif et font intervenir le couplage métabolique avec les astrocytes pour se défendre (**Hamby et al., 2010**). Par conséquent, les astrocytes migrent au site de dommage neuronal et adoptent des modifications moléculaires et morphologiques, par un processus nommé astrogliose, dont l'augmentation de l'expression de la GFAP (protéine acide fibrillaire gliale), l'hypertrophie du soma, la production de glutathion, le relargage de l'adénosine, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α) et des ROS ainsi que des modifications des organites intracellulaires (dilatation du réticulum endoplasmique et des mitochondries) (**Hamby et al., 2010**). Cette astrogliose peut également s'avérer délétère, les fonctions astrocytaires peuvent être déficientes de façon transitoire ou prolongée, ce qui affecte le fonctionnement neuronal et peut notamment participer à la physiopathologie des maladies neurodégénératives (**Hamby et al., 2001**). Une légère astrogliose accompagne aussi le vieillissement cérébral, mais elle est nettement plus importante dans de nombreuses pathologies neurodégénératives chroniques comme la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Huntington et la MA (**Abraham, 2001**).

Pendant la phase précoces de la MA, des astrocytes réactifs ont été détectés dans les cerveaux des patients avant l'apparition des symptômes cliniques (**Owen et al., 2009; Carter et al., 2010**), ils sont principalement localisés dans la couche moléculaire du cortex cérébral et autour des plaques amyloïdes (**Nagele et al., 2004**).

L'atténuation de l'activation des astrocytes accélère la pathogenèse des plaques amyloïdes chez des souris APP / PS1 (**Kraft et al., 2013**), ce qu'est en faveur d'un rôle neuroprotecteur des astrocytes. En effet, les astrocytes sont capables de phagocyter, de dégrader l'A β (**Koistinaho et al., 2004**) et de réguler sa phagocytose par la microglie (**Terwel et al., 2011**). Ils migrent vers les plaques amyloïdes (**Pihlaja et al., 2008**) et fixent le peptide A β grâce à des récepteurs membranaire spécifiques capables de se lier à l'A β comme les récepteurs des produits terminaux de glycations (i.e RAGEs : Receptor for advanced glycation endproducts), le récepteur Toll-like de type 4 (TLR4), des proteoglycans,... (**Medeiros et al., 2012**). Le peptide A β a été détecté dans les astrocytes des patients Alzheimer (**Nagele et al., 2003**). Une fois fixé, l'A β est internalisé puis dégradé au niveau des lysosomes. Ce ci corrèle bien avec une baisse du taux d'A β (**Wyss-Corayet et al., 2003; Koistinaho et al., 2004**). En faveur de ces résultats, une étude récente menée par Xiao et ces collaborateurs sur un modèle de souris de la

MA (AD / PS1dE9) montre que l'amélioration de la biogenèse lysosomale, sélectivement dans les astrocytes, modifie la pathologie amyloïde (**Xiao *et al.*, 2014**).

Par ailleurs, cette réponse dépend de la phase cellulaire de la MA et de la région du cerveau touchée (**Olabarria *et al.*, 2010**). Plus tard, cette fonction est modifiée dans le cas de la MA (**Wyss-Coray *et al.*, 2003**). Conformément à ces observations, les lésions tissulaires associée à l'Aβ corrént bien avec l'activation astrocytaire (**Nagele *et al.*, 2003**; **Simpson *et al.*, 2010**).

L'astrogliose est bénéfique ou nuisible demeure encore une question ouverte, elle a une forte incidence sur la progression de la maladie. Par exemple, l'expression de la protéine tau astrocytaire résulte de la baisse de l'expression et de la fonction des transporteurs de glutamate glial EAAT1 et 2 ce qui accentue la dégénérescence axonale et la mort des neurones (**Forman *et al.*, 2005**; **Tian *et al.*, 2010**). Les activités métaboliques des astrocytes, y compris la production du peroxyde d'hydrogène, du GSH, la production d'énergie et la signalisation du calcium sont altérées (**Bezprozvanny *et al.*, 2008**; **Allaman *et al.*, 2010**; **Lim *et al.*, 2014**). Ces changements métaboliques conduisent à la mort des neurones et des astrocytes, et favorise plus l'accumulation de plaques amyloïdes et la formation de DNF (**Demetrius *et al.*, 2014**). Les astrocytes activés augmentent également la réponse inflammatoire par la sécrétion de chémokines et de molécules d'adhésion qui favorisent l'infiltration de lymphocytes périphériques (**Moynagh *et al.*, 2005**).

6.2. Les cellules microgliales

6.2.1. Propriétés et activités microgliales

Les cellules microgliales ou microglies sont les premiers médiateurs de la réponse immunitaire cérébrale. Ce sont les cellules effectrices principales de l'immunité innée. Elles sont aussi appelées gardien du système nerveux central puisqu'elles possèdent aussi des fonctions physiologiques cruciales au cours du développement et chez l'adulte. Les microglies assurent entre autres le maintien du fonctionnement normal des neurones dans le cerveau adulte par la régulation de la plasticité synaptique et la transmission neuronale (**Wake *et al.*, 2009**; **Tremblay *et al.*, 2010**; **Paolicelli *et al.*, 2011**; **Schafer *et al.*, 2012**; **Salter *et al.*, 2014**). Elles sont aussi capables d'induire l'apoptose de certaines populations de neurones en développement, de contrôler la synaptogénèse, de synthétiser des facteurs neurotrophiques et de réguler la transmission synaptique (**Elkabes *et al.*, 1996**; **Marin-Teva *et al.*, 2004**; **Roumier *et al.*, 2004**; **Coull *et al.*, 2005**).

Les microglies sont présentes dans tout le cerveau avec quelques caractéristiques régionales

(nombre, morphologie et phénotype) (Barron *et al.*, 1995; Kettenmann *et al.*, 2011). Elles représentent près de 15 à 20% des cellules totales du cerveau (Carson *et al.*, 2006), avec un plus grand nombre de cellules microgliales dans la substance grise comparée à la substance blanche. La plupart des cellules microgliales adopte une morphologie qui la différencie des autres types cellulaires gliaux, les astrocytes et les oligodendrocytes. Elles se caractérisent par un corps cellulaire de dimension réduite et de nombreux prolongements cytoplasmiques tortueux et ramifiés alignés le long des neurites. Cette apparence est associée au phénotype quiescent (Streit *et al.*, 1999). Pourtant ce terme est inadéquat car ces cellules sont loin d'être inactives comme démontré par des analyses d'enregistrement d'activité au cours du temps (time-lapse) (Stence *et al.*, 2001) ou par microscopie bi-photonique (Davalos *et al.*, 2005; Nimmerjahn *et al.*, 2005), ainsi que par imagerie en temps réel que le corps cellulaire des cellules microgliales est statique et que ses prolongements sont constamment en mouvement et très sensibles aux changements de leur microenvironnement, scrutant l'espace extracellulaire du parenchyme du système nerveux central (Davalos *et al.*, 2005; Raivich *et al.*, 2005). En effet, dans les conditions physiologiques, le rôle de la microglie est d'éliminer les métabolites en excès et les débris tissulaires et de stimuler la réparation des tissus (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Par ailleurs, sous l'action d'un stimulus physiologique ou d'un stress, ces cellules peuvent être activées et mettent en place une réponse immune afin de lutter contre l'agression et afin de permettre une régulation de l'homéostasie du SNC. Le processus d'activation est caractérisé par des changements morphologiques. La microglie activée prend une forme amiboïde, avec un large corps cellulaire contenant une grande quantité de cytoplasme et des ramifications rétractées (Figure 14) (Kreutzberg *et al.*, 1996). Ainsi activées les microglies produisent des médiateurs de l'inflammation : complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II), cytokines pro-inflammatoires, chimiokines, radicaux libres et protéines du complément, tous participant à la réponse inflammatoire (Moore *et al.*, 2002).

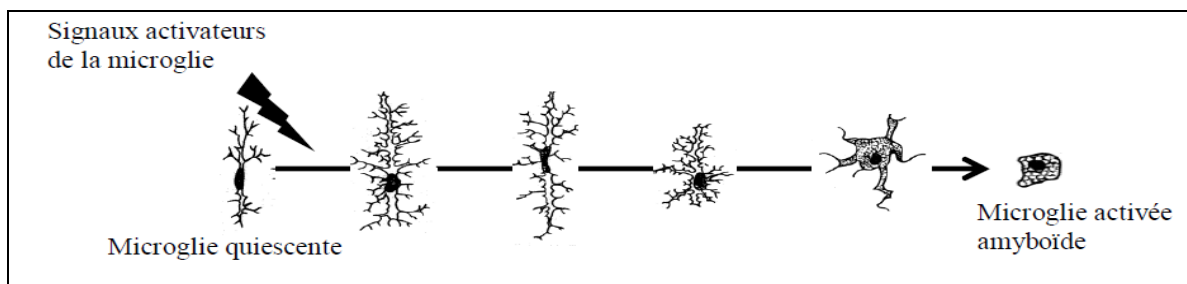


Figure 14: Activation d'une cellule microgliale, du stade quiescent (faiblement ramifié) au stade amyboïde (Kreutzberg *et al.*, 1996)

L'activation microgliale est une caractéristique importante dans de nombreuses pathologies neurologiques dont la sclérose en plaques, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson (**Wyss-Coray et al., 2012**), et la MA (**Mandrekar-Colucci et al., 2011**). En outre, une altération de l'activité microgliale est associée à une réduction de la plasticité synaptique et de l'activité neuronale ce qui aboutit à des troubles de l'activité motrice et d'humeur comme ceux observés dans le cas de la MA (**Kettenmann et al., 2013; Parkhurst et al., 2013; Zhan et al., 2014; Santos et al., 2015; Szalay et al., 2016; Torres et al., 2016**).

Une bonne signalisation neurone-microglie est essentielle pour affiner les processus fondamentaux dans le SNC (**Prinz et al., 2014; Yirmiya et al., 2015; Rohan et al., 2016**). Les microglies sont capables de créer un environnement neuroprotecteur en libérant des facteurs neurotrophiques et des cytokines anti-inflammatoires dans des conditions physiologiques (**Elkabes et al., 1996; Batchelor et al., 2002; Coull et al., 2005; Vukovic et al., 2012; Bechade et al., 2013**). Vice versa, les signaux suppresseurs neuronales y compris restreignent l'activité des microglies dans le cerveau sain (**Polazzi et al., 2010; Saijo et al., 2011; Li et al., 2012; Eyo et al., 2013**). Ainsi, des interactions aberrantes entre neurone et microglie ont été largement étudiées dans plusieurs conditions pathologiques allant de lésions cérébrales aiguës à la neurodégénérescence chronique comme la MA. La perte du rétrocontrôle neuronale sur la microglie en raison d'un dysfonctionnement neuronal ou la dégénérescence peut déclencher l'activation de la microglie (**Ransohoff et al., 2010; Saijo et al., 2011; Wolf et al., 2013; Biber et al., 2014; Cardona et al., 2015**).

6.2.2. Contribution des cellules microgliales dans la Maladie d'Alzheimer

La MA est la première maladie neurodégénérative pour laquelle le lien avec l'activation microgliale a été établi (**Block et al., 2005**). Un nombre croissant d'évidences commencent à montrer l'augmentation du taux des espèces réactives d'oxygène, l'activation du système du complément et la libération des cytokines pro-inflammatoires dans le sérum et le tissu cérébral de patients MA par rapport à des témoins du même âge, l'accumulation des microglies activées agrégées aux plaques séniles dans le cortex cérébral et la présence de peptide A β dans les microglies activées et les astrocytes (**Haga et al., 1989; Fillit et al., 1991; MC Geer et al., 1992; Varnum et al., 2012**). En complément, aux données épidémiologiques indiquant que la consommation chronique d'anti-inflammatoires non stéroïdiens diminue le risque de développer la MA (**Tang et al., 2011**). Ces données sont à la base de l'hypothèse inflammatoire de la MA, qui désigne une réponse inflammatoire auto-entretenue comme directement responsable de la perte neuronale, et force motrice de la pathologie (**Akiyama et**

al., 2000; **Thominiaux et al.**, 2007). Le corollaire de cette hypothèse est une activation microgliale précoce, qui précède la symptomatologie clinique. Ces éléments ont conduit à considérer que la mort neuronale dans la MA n'est pas seulement due aux dépôts du peptide A β ou à l'accumulation de la protéine tau, mais aussi à la dérégulation de la réponse inflammatoire et de la réponse du cerveau au stress oxydatif (**McGeer et al.**, 1995).

La fonction microgliale est souvent décrite comme une épée à double tranchant, car elles médiatisent les effets neuroprotecteurs et neurotoxiques (**Block et al.**, 2007; **Biber et al.**, 2014; **Crotti et al.**, 2016).

Tôt dans l'évolution de la pathologie, et ce bien avant que les plaques seniles apparaissent, un nombre croissant d'évidences indique que la microglie pourrait être protectrice et aboutit à la phagocytose de l'amyloïde par contre elles sont incapables de phagocyter les plaques. Par exemple, chez un des modèles murins pour la MA (souris Tg2576), une abolition du recrutement microgliale conduit au développement précoce de dépôts amyloïdes et ce associé à une augmentation de la mortalité de ces souris (**Simard et al.**, 2006).

6.3. Oligodendrocytes

6.3.1. Origine, maturation et activités des oligodendrocytes

Les oligodendrocytes, initialement décrits en 1928 par Del Rio Hortega, sont les cellules productrices de myéline dans le SNC. Suite à une activation de la voie oligodendrocytaire, ces cellules se différencient à partir des cellules multipotentes, produites pendant le développement, provenant des zones germinales du SNC appelées cellules progénitrices oligodendrocytaires (OPC) donnant progressivement naissance aux progéniteurs, préoligodendrocytes, oligodendrocytes immatures, oligodendrocytes matures non myélinisants et enfin aux oligodendrocytes matures myélinisantes, capable de produire la myéline (**Barateiro et al.**, 2014). La maturation et la différenciation sont deux processus postnatals (**Dean et al.**, 2011). Une petite proportion des OPC, générées pendant le développement, est maintenue dans un état immature et lentement prolifératif ou quiescent dans toutes les régions du SNC représentant 2 à 9 % de la population cellulaire cérébrale totale (**Dawson et al.**, 2003). Ces cellules représentent un réservoir endogène d'oligodendrocytes, produites en permanence par des cellules du parenchyme ou de la ZSA (Zone Subventriculaire antérieure) (**Dawson et al.**, 2003 ; **Menn et al.**, 2006; **Ferent et al.**, 2013).

Les étapes de maturation sont accompagnées par l'expression de nombreux canaux ioniques

dépendants du voltage impliquant à la fois les canaux potassium à rectification entrante et sortante, les canaux sodium et différentes classe des canaux calcium (**Barres et al., 1990; Verkhratsky et al., 1990; Berger et al., 1992; Williamson et al., 1997; Coppi et al., 2015**). Récemment, le rôle des récepteurs d'adénosine de type A1 et A2_A exprimés par les OPC a été identifié. Ces récepteurs ont un rôle déterminant dans la maturation et la prolifération des OPC. Comme évalué sur OPC la stimulation des récepteurs A1, favorise la maturation des oligodendrocytes et inhibe leur prolifération. Au contraire, la stimulation des récepteurs A2_A inhibe la maturation. Les effets médiés par le récepteur A1 et A2_A sont associés à des modulations opposées des courants potassiques à rectification retardée dirigée directement par la / les sous-unité (s) de protéine G ou indirectement par modulation des taux intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (**Coppi et al., 2013**). L'activation des récepteurs A1 est également obtenue par stimulation sélective du récepteur purinergique couplé à la protéine G GPR17«P2Y-like receptor GPR17» capable de diminuer l'activité d'AC et d'AMPC et stimule la maturation des OPC (**Figure 15**) (**Lecca et al., 2008; Fumagalli et al., 2011; Coppi et al., 2013**). Les récepteurs A1 et A2_A pourraient représenter de nouvelles cibles moléculaires pour des médicaments utiles dans des pathologies démyélinisantes, telles que la sclérose en plaques, les accidents vasculaires cérébraux et le traumatisme crânien (**Coppi et al., 2015**).

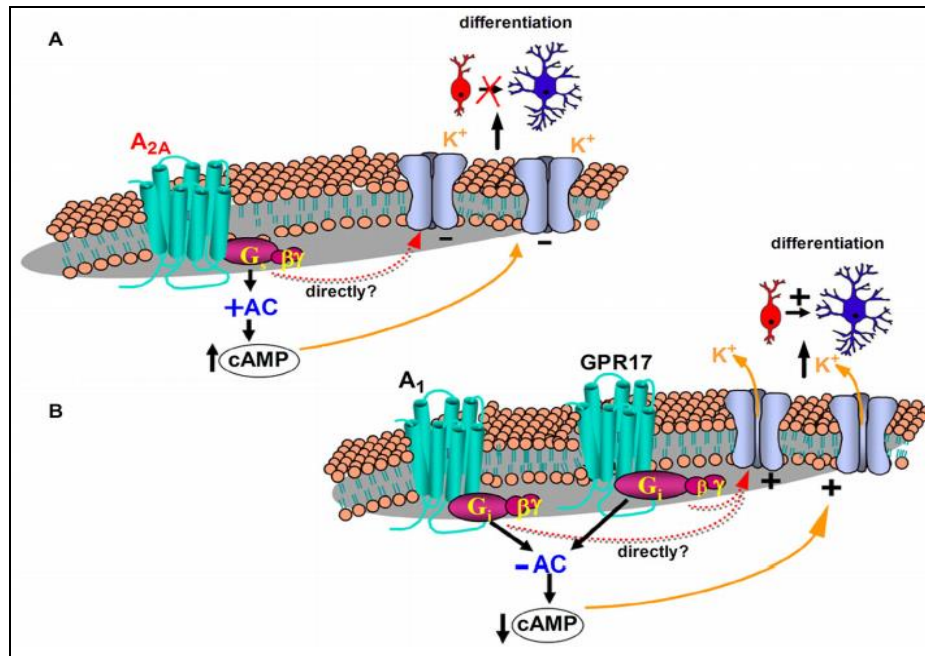


Figure 15: Modulation des canaux potassium à rectification retardée et différenciation des cellules progénitrices oligodendrocytaires (OPC)

(A) La stimulation du sous-type A_{2A} du récepteur Adénosine couplé à la protéine G_s augmente l'activité de l'adényl cyclase (AC) et l'adénosine cyclique intracellulaire monophosphate (cAMP), diminue l'amplitude des courants potassium à rectification retardée et inhibe la différenciation OPC (Coppi et al., 2013). (B) Le sous-type A₁ du récepteur Adénosine couplé à la protéine G_i diminue l'activité du AC et de l'AMPc, augmente l'amplitude des courants potassium à rectification retardé (K_{DR}) (Coppi et al., 2013) et stimule la différenciation des OPC en cellules plus matures (Stevens et al., 2002). L'amplitude accrue des courants potassium à rectification retardé est également obtenue par stimulation sélective de GPR17 (Coppi et al., 2013), une stimulation des récepteurs P2Y- comme diminue l'activité d'AC et d'AMPc et stimule la maturation des OPC (Lecca et al., 2008; Fumagalli et al., 2011). La modulation des courants potassium à rectification retardé peut être dirigée directement par la / les sous-unité (s) de protéine G ou indirectement par modulation des taux intracellulaires d'AMPc.

Le processus de différenciation des OPC est aussi accompagné par une expression différentielle de plusieurs protéines membranaires spécifiques. Par ailleurs, l'expression de ces protéines oligodendrocytaires au cours de la maturation est utilisée comme marqueur de différenciation (Tableau 1) (Sommer et al., 1981; Goldman et al., 1984; Warrington et al., 1992; Gallo et al., 1995; Jung et al., 1996; Coppi et al., 2015).

Tableau 1: Antigènes spécifique des différentes étapes de maturation des oligodendrocytes (Sommer *et al.*, 1981; Raff *et al.*, 1983; Goldman *et al.*, 1984; Warrington *et al.*, 1992 ; Gallo *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1996)

Cellules progénitrices oligodendrocytaires	Pré oligodendrocytes	Oligodendrocytes immatures	Oligodendrocytes matures
Nestin ⁺	PDGFR α ⁺	O4 ⁺	RIP ⁺
PDGFR α ⁺	A2B5 ⁺	RIP ⁺	GalC ⁺
A2B5 ⁺	NG2/AN2 ⁺	GalC ⁺	CNP ⁺
NG2/AN2 ⁺	GD3 ⁺	CNP ⁺	MBP ⁺
GD3 ⁺	PLP DM20 ⁺		PLP ⁺
PLP DM20 ⁺	O4 ⁺		MAG ⁺
Olig2 ⁺	CNP ⁺		

Les oligodendrocytes peuvent avoir un rôle trophique, en sécrétant des facteurs neurotrophiques comme le BDNF, le GDNF (pour « Brain ou Glial Derived Neurotrophic Factor » respectivement) et l'IGF-1 (pour « Insulin Growth Factor 1 ») (Bradl *et al.*, 2009). Il n'est pas aussi étonnant de trouver, de même que pour la microglie et les astrocytes, un nombre d'oligodendrocytes activés avec une réponse pro-inflammatoire augmentée durant le vieillissement (Hinman *et al.*, 2007). De plus, les oligodendrocytes ont le plus pouvoir antioxydant le plus important (Hirrlinger *et al.*, 2002).

La particularité la plus importante des oligodendrocytes est qu'elles sont les seules formatrices de la gaine de myéline et responsables de la myélinisation du SNC. La myélinisation axonale est un phénomène rapide et hautement régulé (Emery, 2010). Durant le développement, le premier signal impliqué dans la myélinisation est l'activité électrique neuronale. Dès lors, d'autres acteurs interviennent, comme certains ligands exprimés au niveau neuronal ou certaines molécules diffusibles (Bradl *et al.*, 2009; Emery, 2010). La myéline permet la conduction saltatoire de l'influx nerveux permettant de diminuer le coût énergétique de la propagation du potentiel d'action (Stiefel *et al.*, 2013). Cette fonction est assurée grâce à la présence des canaux dépendant du voltage au niveau des sites particuliers, assurant ainsi la transmission rapide de l'influx nerveux et le maintien de l'intégrité axonale. La région nodale, nœud de Ranvier, est caractérisée par une densité élevée de canaux de Na⁺ dépendant du voltage (responsables de la génération du potentiel d'action). La région paranodique (adjacente aux nœuds de Ranvier) est responsable du maintien des canaux K⁺ présent dans la section juxtaparanodale. Cette section est primordiale vue qu'elle protège l'axone des excitations réentrantes et assure le maintien du potentiel de repos dans la région

internodale (**Poliak et al., 2003**). Chaque couche de myéline est connectée au soma de l'oligodendrocyte par un seul prolongement cellulaire, un oligodendrocyte pouvant avoir jusqu'à 50 prolongements (**Figure 16**) (**Peters et al., 1964**). Il a été suggéré qu'une délocalisation des protéines associées au nœud de Ranvier principalement les canaux K^+ pourrait moduler la transmission de l'influx nerveux (**Hinman et al., 2007**).

La myéline permet la conduction saltatoire de l'influx nerveux, mais aussi de diminuer le coût énergétique de la propagation des potentiels d'action qui n'ont ainsi pas besoin d'être générés sur toute la longueur de l'axone (**Stiefel et al., 2013**).

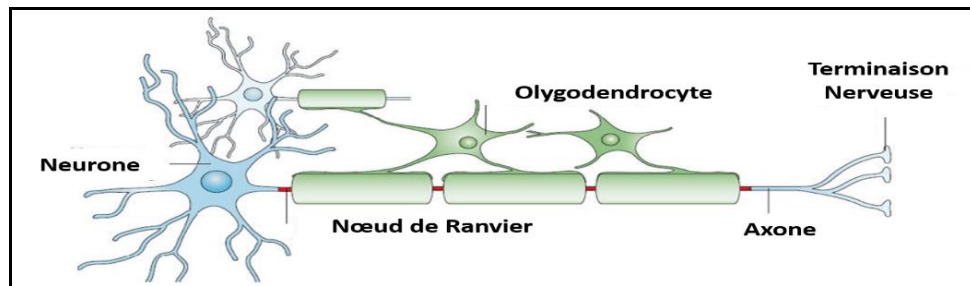


Figure 16: Interaction entre neurone et oligodendrocyte (Poliak et al., 2013)

La myéline est un complexe lipoprotéique composé de 65-80 % de lipides et de 20-35 % de protéines (**Jahnet et al., 2009**). La myéline préserve à elle seule 70 % du contenu cérébral en cholestérol (**Bjorkhem et al., 2004**). Les lipides constituant la myéline sont les glycosphingolipides, le cholestérol, les galactolipides et le plasmalogen dans les proportions suivantes : (2: 2: 1: 1) (**Baumann et al., 2001; Jahn et al., 2009**). Les différentes protéines de la myéline qui existent présentent des localisations et des proportions différentes dans le SNC. Dans le SNC, les protéines de la myéline spécifiquement synthétisées par les oligodendrocytes sont la Myelin Proteolipid Protein (PLP) et la Myelin Basic Protein (MBP) qui constituent à elles seules 80 % des protéines totales. Dans des proportions nettement moins abondantes, on retrouve la Myelin Associated Glycoprotein (MAG), la Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) ou encore 2':3' Cyclic Nucleotide 3'Phosphodiesterase (CNP). Leurs localisations sub cellulaires montrent des répartitions très spécifiques.

Myelin Proteolipid Protein (PLP)

La PLP représente près de la moitié des protéines de la myéline (**Stecca et al., 2000**). Elle est formée de 4 hélices α hydrophobes formant les domaines transmembranaires, de 2 domaines extracellulaires et de 3 domaines cytoplasmiques comprenant les extrémités NH₂ et COOH.

L'invalidation de la PLP chez la souris par Knock Out (KO) ou ARN anti sens démontre la formation d'une myéline compacte par les oligodendrocytes (**Boison et al., 1995 ; Klugmann et al., 1997**). Enfin la découverte que PLP pouvait interagir avec l'αv intégrine suggère un rôle de cette protéine comme médiateur de signaux intracellulaires importants pour le développement oligodendrocytaire (**Klugmann et al., 1997**). Des mutations dans le gène PLP provoquent chez l'Homme un groupe de maladies génétiques qui affectent la myéline, appelées les leucodystrophies. Par exemple, la maladie de Pelizaeus Merzbacher (PMD) qui affecte la coordination, les fonctions motrices et cognitives (**Gudz et al., 2002**).

Myelin Basic Protein (MBP)

La MBP représente 30 % des protéines de la myéline du SNC. Elle est la seule protéine fondamentale à la structuration de l'architecture de la myéline du SNC. Le modèle de souris Shiverer qui présente une délétion naturelle d'une grande part du gène codant pour la protéine MBP, ne possède pratiquement pas de myéline compacte dans le SNC (**Readhead et al., 1990**). Le rat Long Evans shaker portant une mutation de MBP entraînant une transcription aberrante, ne possède pas non plus de myéline compacte dans le SNC (**Carré et al., 2002**).

7.3.2. Contribution des oligodendrocytes dans la maladie d'Alzheimer

Les rôles des oligodendrocytes dans la MA sont encore moins étudiés que ceux des astrocytes, bien que plusieurs études suggèrent un rôle très important des oligodendrocytes lors de la phase cellulaire de la maladie (**Ettle et al., 2015**). Ces cellules représentent 75 % des cellules gliales dans le néocortex et par conséquent représentent la population majoritaire des cellules non-neuronales dans le Cerveau (**Pelvig et al., 2008**). Elles sont considérées comme des cellules hautement vulnérables, leur nombre est réduit de 27% dans le cerveau des personnes âgées (**Pelvig et al., 2008; Bartzoki, 2011**). La principale conséquence de la mort des oligodendrocytes consiste en la démyélination des neurones. Les fibres myélinisées elles-mêmes subissent des altérations supposées liées à l'inflammation chronique associée au vieillissement. De nombreuses études ont permis de montrer une réduction du nombre de fibres ainsi qu'une réduction de la longueur totale de fibres allant jusqu'à 50% (**Meier-Ruge et al., 1992; Tang et al., 1997; Marner et al., 2003**). La démyélinisation est observée en cas de maladies neurodégénératives, mais également après un traumatisme, une ischémie ou une infection virale (**Edgar et al., 2012**). De nombreuses études ont montrés que le processus de démyélinisation débute dès l'âge adulte puis s'accélère pendant le vieillissement qui sous-tend le déclin cognitif associé aux maladies neurodégénératives y compris la MA (**Bartzokis et al., 2004; Bartzokis et al., 2010 ; Bartzokis et al., 2011**). Cependant, les mécanismes exacts qui

conduisent à la perte des oligodendrocytes et à la démyélinisation pendant la MA n'ont pas encore bien élucidés. Les souris modèles de la MA présentent des altérations de la myéline avant l'apparition des dépôts amyloïde ou la modification de la protéine tau (**Desai et al., 2009; Desai et al., 2010**). Par ailleurs, une multitude des travaux *in vitro* indique une dégénérescence de la matière blanche médiée par un oligomère A β contribuant aux déconnexions neuronales (**Horiuchi et al., 2012**). Pendant les premiers stades présymptomatiques de la MA, la toxicité induite par l'A β corrèle avec la démyélinisation et la progression temporelle et spatiale des troubles cognitifs (**Desai et al., 2010**). De plus, les analyses immunohistochimiques ont révélé la coexistence du peptide A β et des protéines oligodendrocytaires, ce qui implique que la dégénérescence cellulaire peut précéder la formation de plaques amyloïdes (**Singhrao et al., 1994**). Une injection stéréotaxique d'A β 1-42 en corps calleux a entraîné des dommages de la substance blanche et induit la mort des oligodendrocytes (**Jantaratnotai et al., 2003**). La toxicité d'A β n'est pas limitée aux fragments d'A β ₁₋₄₂, il a été rapporté que l'A β ₁₋₄₀ et l'A β ₂₅₋₃₅ pourraient être toxiques (**Xu et al., 2001; Takao et al., 2004; Zarrouk et al., 2015**).

En réponse à une démyélinisation, une remyélinisation spontanée se produit par génération des oligodendrocytes matures après recrutement, migration au site lésionnel, prolifération et différenciation des OPC (**Dawson et al., 2003; Menn et al., 2006; Ferent et al., 2013**). Braak suggère un lien entre la perte neuronale et leur état de myélinisation vu que la propagation des DNF est inversement associée au degré de myélinisation (**Braak et al., 1996**). Bartzokis a démontré qu'une remyélinisation axonale très fine a été observée au niveau du lobe frontal et temporal (**Bartzokis, 2011**). L'analyse par résonance magnétique suggère que la remyélinisation rend les neurones dans ces zones plus sensibles aux différents inducteurs du stress ce qui favorise le développement des maladies neurodégénératives et des troubles neuropsychiatriques liée à l'âge (**Bartzokis, 2011**). De plus, l'analyse du cortex des patients Alzheimer a révélé une diminution du nombre des OPC comparativement aux personnes âgées (**Behrendt et al., 2013**). Une baisse des taux des OPC et des pré oligodendrocytes a été également détectée dans le LCR de patients atteints de MA est corrélée avec des biomarqueurs de la MA tels que A β ₁₋₄₂ et la protéine tau phosphorylée (**Nielsen et al., 2013**). Les études des effets directs de l'A β sur les OPC proviennent des études *in vitro* démontrant l'apoptose des OPC, ainsi que la baisse du nombre des OPC et des pré oligodendrocytes (**Desai et al., 2010; Nielsen et al., 2013**). Il a été décrit qu'en présence d'A β , les OPC perdent leur capacité à se différencier en oligodendrocytes matures pendant (**Desai et al., 2011; Behrendt**

et al., 2013). Ainsi, une mauvaise transmission de l'influx nerveux pourrait être la cause des maladies démyélinisation liées à l'âge (**Bartzokis, 2011**). La forte démyélinisation observé chez la patients Alzheimer et plus particulièrement chez les porteurs de l'APOE4 représente l'un des arguments les plus convaincants pour se concentrer sur l'étude des oligodendrocytes (**Scheltens et al., 1992; Bartzokis, 2011**). Il semble probable que la perturbation de la viabilité cellulaire des oligodendrocytes aura un impact sur l'intégrité des neurones. Il est clair que les gaines de myéline fournissent une protection physique aux axones (**Nave, 2010**).

7. Maladie d'Alzheimer et altérations des organites cellulaires

7.1. Implication des mitochondries dans la physiopathologie de la MA

Différentes altérations structurales et métaboliques placent la pathologie mitochondriale au coeur de l'étiopathogénie de la MA.

Des déformations mitochondriales ont été mise en évidence dès les premiers stades de la MA, en premier lieu dans les neurites puis autour des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrillaires (**Wisniewski et al., 1970; Johnson et al., 1978**). Le cortex fronto-pariétal montre une baisse de 25 % du nombre des mitochondries mais une augmentation de leur taille (**Hirai et al., 2001**). La répartition des mitochondries dans les différents compartiments cellulaires de diverses régions comme le cortex cérébral, le thalamus, le striatum, le cervelet ou le locus coeruleus est modifiée comparativement à des sujets témoins de même âge (**Lin et al., 2006**). Ces organites sont moins nombreux et plus petit dans les dendrites distaux et contribuent à la perte des épines et de l'arborisation dendritiques et synaptique (**Stokin et al., 2005; Baloyannis et al., 2006**). Des fissions et des fusions anormales des mitochondries ont été rapportées dans les fibroblastes et l'hippocampe des patients (**Wang et al., 2009**).

D'autres altérations métaboliques étroitement associées à la mitochondrie ont été détectées chez les patients. Par exemple, trois principaux complexes enzymatique du cycle de Krebs, la pyruvate déshydrogénase servant à transformer le pyruvate en acetyl-CoA (**Perry et al., 1980; Yates et al., 1990**), l'isocitrate déshydrogénase et l' α -kétoglutarate déshydrogénase présentent une diminution d'activité dans le cerveau et les fibroblastes de patients atteints de la MA (**Huang et al., 2003; Bubber et al., 2005**). Une diminution des activités des complexes de la chaîne respiratoire I (NADH déshydrogénase), III (coenzyme Q-cytochrome c réductase) et IV (cytochrome c oxydase) a été aussi observée dans les plaquettes, les lymphocytes et le cerveau de patients (**Kish et al., 1992; Bosetti et al., 2002; Valla et al., 2006**).

Par ailleurs, la mitochondrie responsable de 90 % de la production de ROS contribuerait

beaucoup aux altérations des macromolécules cellulaires liées au stress oxydant : ADN, protéines et lipides (Gibson *et al.*, 1998; Maurer *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005 ; Devi *et al.*, 2006; Sultana *et al.*, 2006). Il est important de noter que plusieurs mutations ponctuelles du génome mitochondrial, sous-unités I, II et III du cytochrome c, ont été décrites chez les patients Alzheimer (Qiu *et al.*, 2001; Hamblet *et al.*, 2006).

7.2. Implication des peroxysomes dans la physiopathologie de la MA

Les peroxysomes sont impliqués dans une variété de voies métaboliques assurée par différents complexes enzymatiques, ce qui met en évidence l'importance de cette organelle pour le bon fonctionnement cellulaire. (Wanders *et al.*, 2006). Ces organites intracellulaires catalysent des réactions essentielles pour la cellule comme :

- Biosynthèse des lipides (éthers de phospholipides/plasmagènes ; acides biliaires, cholestérol, élongation des acides gras),
- β -oxydation des acides gras (acides gras à très longue chaîne, acides dicarboxyliques, acides gras à chaîne branchées, acides gras insaturés, acide arachidonique et xénobiotiques),
- α -oxydation de l'acide phytanique,
- Activation des acides gras à longues et très longues chaîne,
- Régulation du rapport acyl-CoA/CoA,
- Métabolisme des acides aminés (biosynthèse de cystéine dégradation des polyamines),
- Catabolisme des purines,
- Métabolisme de glyoxylate et dicarboxylate,
- Synthèse de glycérol,
- Métabolisme du nicotinate et nicotinamide,
- Métabolisme des rétinoïdes.

Toutes ces réactions d'oxydation conduisent à la production de H₂O₂ neutralisé par la catalase peroxysomale.

Le défaut de la biogenèse du peroxysome ou le désordre d'une ou de plusieurs fonctions peroxysomales aboutissent à des maladies sévères chez l'homme dont les plus fréquentes affectent le système nerveux central : Syndrome de Zellweger, X-linked

Adrenoleukodystrophy (X-ALD), maladie de Refsum (**Powers et al., 1998; Baes et al., 2009**). Les maladies peroxysomales sont le plus souvent des maladies héréditaires (**Wanders et al., 2006**). La diminution de l'ensemble des activités peroxysomales, y compris la diminution de l'activité catalase (**Rudiger et al., 1998**) et de synthèse de plasmalogènes pendant le processus de vieillissement cellulaire est décrite comme un principal acteurs favorisant le développement des maladies neurodégénératives liée à l'âge (**Rudiger et al., 2005**). Plusieurs données renforcent l'hypothèse de l'implication du dysfonctionnement peroxysomal dans la survenue et la potentialisation de la MA.

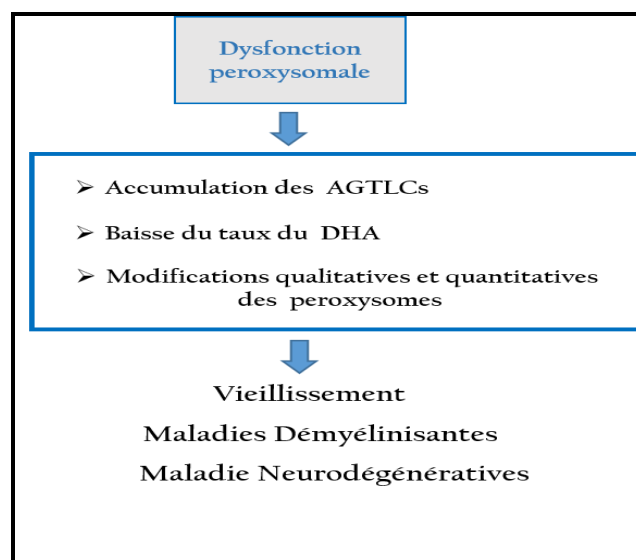


Figure 17: Incidence du dysfonctionnement peroxysomal dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives (Trompier et al., 2014)

La première preuve du rôle des peroxysomes dans le développement de la MA a été établie sur des cultures primaires de neurones hippocampiques de rat. Dans ces cellules, la prolifération peroxysomale, induite par un puissant agoniste du PPAR α (Wy-14.463) protège contre la mort cellulaire induite par le peptide A β (**Santos et al., 2005**). Les différents isoformes (α , β / δ et γ) de ces récepteurs nucléaires sont capables de lier les AG. Cette interaction entraîne la modulation de nombreux gènes parmi lesquels ceux codant pour des protéines impliquées dans la β -oxydation des AG (**Sampath et al., 2005**). De plus, l'inhibition de la β -oxydation peroxysomale par la thioridazine chez le rat stimule la génération d'A β par induction de l'expression de l'APP et de la β -sécrétase (**Shi et al., 2012**). L'expression du transporteur membranaire peroxysomal ABCD3 et d'ACOX-1, première enzyme de la voie de la β -oxydation des AGTLCs dans le peroxysome, est induite chez des

souris transgéniques portant la mutation Suédoise de l'APP humaine (**Fanelli et al., 2013**). L'atteinte peroxysomale lors de processus d'initiation de la MA se traduit par l'apparition d'altérations peroxysomales observées chez des souris transgénique modèle de la MA (Tg2576) en l'absence de lésions anatomiques caractéristiques de la maladie (**Cimini et al., 2009**).

Chez les patients atteints de la MA, il est bien établi qu'une dysfonction peroxysomale est associée avec le développement de la maladie. En effet, une augmentation de la densité des peroxysomes dans les cellules neuronales et une diminution du nombre des peroxysomes dans les neurites des cerveaux de MA ont été rapportées (**Ksou et al., 2011**). D'autres altérations associées aux activités peroxysomales ont été aussi décrites. Une réduction des niveaux de plasmalogène a été détectée dans différentes régions cérébrales et les érythrocytes des patients atteints de la MA (**Wood., 2010; Igarashi et al., 2011**). Cette réduction du taux du plasmalogène, de l'ordre de 40 % au niveau du cerveau pendant les stades précoces de la maladie, est spécifique à la MA ; elle n'a pas été retrouvée dans les autopsies de cerveau de patients atteints d'autres maladies neurodégénératives tels que la maladie de Huntington ou de Parkinson (**Han et al., 2001**). Les taux de plasmalogènes, aussi bien cérébraux qu'érythrocytaire, sont positivement corrélés au degré de sévérité de la maladie (**Querfurth et al., 2010**). La dérégulation de la β -oxydation peroxysomale a été confortée par l'accumulation de C22:0 et d'AGTLC (C24:0, C26:0) chez les patients atteints de la MA (stade V-VI selon la classification de Braak & Braak). En accord avec ces observations, une accumulation des AGTLC et en particulier de C26:0 a été mise en évidence dans le plasma et les globules rouges de patients déments suggérant une possible dysfonction peroxysomale (**Zarrouk et al., 2015**). De ce fait, le C26:0 a été proposé comme potentiel biomarqueur sanguin de démence. Une diminution des taux de DHA a aussi été observée au niveau du cerveau et du foie de patients Alzheimer (**Astarita et al., 2010**).

II. Processus toxiques associés à la maladie d'Alzheimer

1. Stress oxydant

1.1. Différentes formes de radicaux libres

En chimie, l'oxydation fait référence à une perte d'électron par une molécule et la production d'un radical libre ou d'une molécule très instable (espèce réactive de l'oxygène) pouvant générer un radical libre par interaction avec une autre molécule. Les espèces réactives générées sont souvent des radicaux libres, c'est-à-dire des espèces chimiques ayant un

électron non apparié sur la dernière couche électronique. Ces espèces réactives sont très instables et ont tendance à récupérer d'autres électrons à partir d'autres substrats biologiques en les oxydant.

Les espèces réactives dérivant de l'oxygène (ROS – Reactive Oxygen Species) ou de l'azote (RNS – Reactive Nitrogen Species) sont les plus majoritaires dans le système cellulaire. Elles comprennent entre autre le radical hydroxyl ($\text{OH}\cdot$) provenant du clivage du peroxyde d'hydrogène par la réaction de Fenton, l'anion superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$) provenant du métabolisme de l'oxygène, les radicaux peroxy ($\text{ROO}\cdot$) provenant de l'oxydation des lipides (peroxydation), l'oxygène singulet (O), le radical alcoyle ($\text{RO}\cdot$), le monoxyde d'azote (NO), le peroxy-nitrite (ONOO^-). D'autres espèces dérivées, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide peroxy-nitrique (ONOOH) et le nitroperoxyde (ONOOH) ne sont pas des radicaux mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux.

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur destruction par des systèmes de défenses anti-oxydantes. Ce stress peut entraîner des dommages aux macromolécules cellulaires qui constituent un élément majeur dans le processus de vieillissement et dans la pathophysiologie de nombreuses maladies (**Harman *et al.*, 1956**).

Les ROS peuvent être produits dans différents compartiments cellulaires par réduction du dioxygène (O_2) en présence du cofacteur NADPH par la NADPH oxydase, mais aussi par les cyclooxygénase (COX), la xanthine oxydase, les 'nitric oxyde synthase' (NOS), les lipooxygénases, certaines enzymes du réticulum endoplasmique lisse (enzymes à cytochrome P450) et celles de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie. La mitochondrie est la principale source de ROS par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait 90 % des ROS cellulaires (**Balaban *et al.*, 2005**) sous l'action d'agents externes physiques (radiation, UV,...), chimiques (xénobiotiques,...) ou mécaniques. L' O_2 est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant deux électrons non appariés sur leur orbitale externe. Il est à l'origine de la formation de ROS. L' O_2 est susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en $\text{O}_2\cdot^-$ instable et peu réactif ou gagner de l'énergie pour donner lieu à l' O fortement réactif qui s'additionne directement sur les doubles liaisons d'acides gras polyinsaturés pour donner des hydroperoxydes (ROOH). L' $\text{O}_2\cdot^-$ est un précurseur d'autres ROS ; il peut gagner 2 atomes d'hydrogène et deux électrons lors d'une réaction enzymatique pour former H_2O_2 extrêmement réactif. En raison de sa longue durée de vie, H_2O_2 possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes

biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production. En présence du Cu^{2+} ou de Fe^{2+} , la réactivité du H_2O_2 est augmentée, il peut se décomposer selon la réaction de Fenton en HO^- et OH^\bullet ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$). L' OH^\bullet est l'espèce la plus instable et la plus réactive de tous les ROS. Sa demie-vie est de l'ordre de la nanoseconde ce qui lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN...) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L' OH^\bullet apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des ROS. Le NO^\bullet est produit par la NOS à partir de l'arginine en faisant intervenir l'arginase par une réaction équimoléculaire ($\text{L-Arginine} + \text{O}_2 \rightarrow \text{L-Citrulline} + \text{NO}^\bullet$) ; lorsque la concentration du cofacteur, tétrahydrobioptéridine (BH_4) diminue, la réaction produit l' $\text{O}_2^{\bullet-}$. Le NO peut également réagir avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ pour donner lieu à un composé très toxique, le peroxyntrite (ONOO^-) (Simonian *et al.*, 1996). Le NO comme $\text{O}_2^{\bullet-}$ n'est pas très réactif mais constitue un radical précurseur pouvant être activé en d'autres espèces plus réactives. Autre que l' ONOO^- , l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut contribuer à la formation d'autres ROS également très réactives.

1.2. Défenses antioxydantes

Pour se protéger contre le développement et la propagation du stress oxydant, la cellule doit assurer l'équilibre entre la production des ROS et les défenses anti-radicalaires. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre des altérations aux macromolécules cellulaires. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants enzymatiques ou non-enzymatiques dans différents compartiments cellulaires (Figure 18) (Packer *et al.*, 1997; Mates *et al.*, 1999 Powers *et al.*, 1999; Dröge ., 2002).

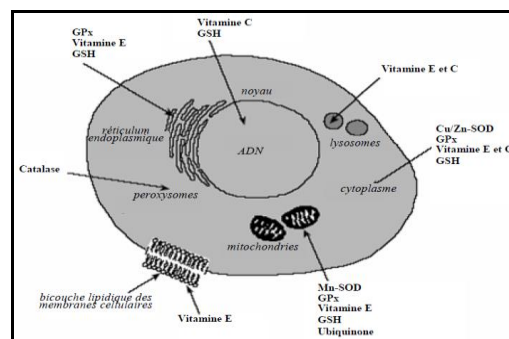


Figure 18: Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule
(Autréaux *et al.*, 2007)

Ces différents systèmes de défenses antioxydantes semblent contrôler le niveau des ROS plutôt que de les éliminer complètement.

Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase. Cette voie est considérée comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS (**Figure 19**).

La SOD catalyse la dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 . Cette dernière existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme nucléaire, cytosolique ou intermembranaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD ; SOD1), une deuxième mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD ; SOD2) et une troisième extracellulaire (EC-SOD ; SOD3) (**Okado-Matsumoto et al., 2001; Sturtz et al., 2001**). Le Cu, le Zn et le Mn représentent dans ce contexte des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Cependant, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, notamment le fer, ils peuvent avoir une action prooxydante (réaction de Fenton). La GPx agit en synergie avec la SOD pour assurer la dismutation du H_2O_2 en H_2O et O_2 par oxydation de deux molécules de glutathion réduit (GSH) en glutathion-disulfure (GSSG) (**Powers et al., 1998; Mates et al., 1999**). Le GSH est régénéré par la glutathion réductase à partir du GSSG grâce à NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant. En effet, plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le GSH est consommé et le GSSG est augmenté (**Ji et al., 1992**). Les GPx sont associées à la membrane mitochondriale, ou à des phospholipides (PHGPx) spécifiquement impliquées dans la diminution de la peroxydation lipidique (**Mates et al., 1999**).

La catalase assure également la dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 . Contrairement à la GPx, l'affinité de la catalase pour H_2O_2 n'est élevée que lorsque les teneurs en H_2O_2 sont élevées (**Powers et al., 1998; Mates et al., 1999**). La catalase se trouve préférentiellement dans les peroxysomes et en faible quantité dans le cytosol.

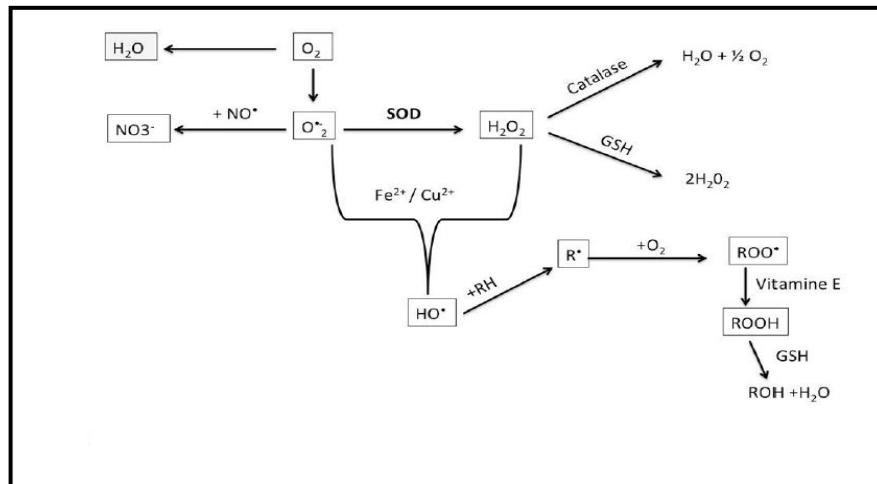


Figure 19: Schéma de défenses antioxydantes enzymatiques

Les antioxydants non-enzymatiques

La plupart des éléments de cette catégorie d'antioxydant n'est pas synthétisée par l'organisme et doit être apportée par l'alimentation. Autres que les oligoéléments (Cu, Zn et Mn) et le GSH utilisés comme cofacteurs des enzymes anti-oxydantes, les principales molécules antioxydantes utilisées par les cellules sont l'ubiquinol, le cytochrome c, la vitamine C (acide ascorbique) et la vitamine E (Power *et al.*, 1998). L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la production et de la propagation de radicaux peroxy. Il est également impliqué dans la régénération de la vitamine E ce qui lui confère un rôle protecteur important contre les ROS (Packer., 1997). Le cytochrome C présent dans l'espace inter-membranaire capte l'électron libre $O_2^{\cdot-}$ produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède son électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de H_2O (kulachev, 1998). La vitamine E neutralise les radicaux peroxydes ($ROO^{\cdot-}$). Etant liposoluble, la vitamine E se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres et empêcher la propagation des réactions de peroxydation lipidique (Packer., 1997; Evans, 2000). Par ailleurs, la vitamine C, hydrosoluble, neutralise $O_2^{\cdot-}$ et OH^{\cdot} dans le cytosol et dans le milieu extracellulaire. Elle réduit aussi le radical α -tocophérol et permet une meilleure efficacité de la vitamine E (Packer., 1997; Evans., 2000).

1.3. Cibles cellulaires du stress oxydatif

ROS et RNS sont des espèces transitoires. Aux doses physiologiques, ces espèces sont des composés indispensables au bon fonctionnement cellulaire. Ils peuvent agir comme messagers intra et extracellulaires et induire des réponses cellulaires face à de nombreux stress. Ils participent également aux cascades de signalisation intracellulaire responsables de la

transcription des gènes du système antioxydant, de la réponse immunitaire (phagocytose, activation des neutrophiles...), de l'apoptose et de nombreux processus physiologiques; Cependant, quand ils sont produits de manière incontrôlée ou chronique, ou lorsque les défenses antioxydantes ne sont pas suffisamment puissantes, l'équilibre redox intra-cellulaire peut être rompu (**Figure 20**) (**Salmeen et al., 2005; Valko et al., 2007**).

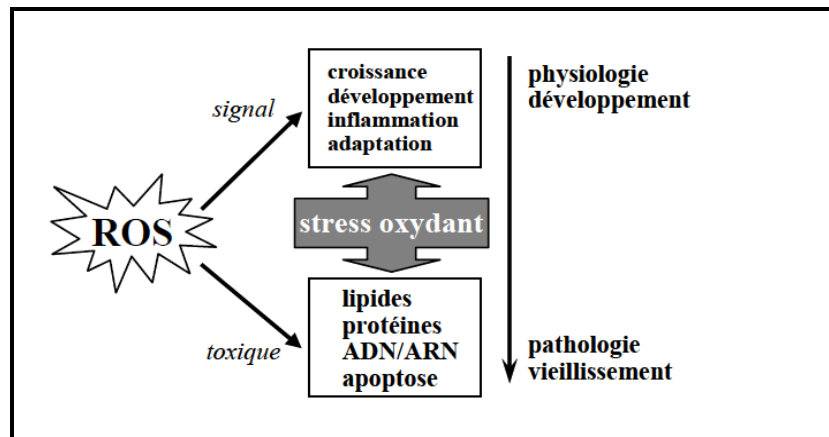


Figure 20: Rôle de l'équilibre redox intra-cellulaire dans le développement, le vieillissement et dans l'installation du processus pathologique

Les radicaux sont cytotoxiques et peuvent causer des dommages à l'intégrité cellulaire. Ils sont considérés comme des importants inducteurs de nombreux processus pathologiques. Leur grande réactivité se traduit par diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation des acides nucléiques (ARN, ADN nucléaire et mitochondrial) (**Wiseman et al., 1996; Marnett, 2000**), des protéines (**Refsgaard et al., 2000; Davies, 2003**), des glucides (**Møller et al., 2011**) ou des lipides (**Barouki, 2006**).

Peroxydation lipidique

Les lipides, notamment ceux de la membrane cellulaire et subcellulaire, sont les premières cibles des ROS en particulier OH^\bullet capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy (ROO^\bullet). Cette réaction est une réaction en chaîne car le ROO^\bullet formé se transforme en peroxyde ($\text{R-O-O-R}'$) au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (**Esterbauer et al., 1992**). Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont les plus sensibles à l'oxydation en raison de la présence de nombreuses insaturations (**Pamplona et al., 2000; Hulbert et al., 2005**) provoquant ainsi une désorganisation membranaire (une perturbation des propriétés physicochimiques des

membranes, des communications intercellulaires et du fonctionnement des enzymes et des récepteurs membranaires) pouvant aboutir à la lyse cellulaire. L'attaque concerne aussi les lipoprotéines circulantes et aboutit à la formation de LDL (Low Density Lipoprotein) oxydées. Le cholestérol membranaire ou celui des lipoprotéines peut aussi être oxydé sur plusieurs sites et généré une grande variété de dérivés oxydés nommés oxystérols. La peroxydation du cholestérol en oxystérols est un exemple de cette notion de chaîne de transmission radicalaire.

Cette attaque radicalaire se déroule en trois phases : initiation, propagation et terminaison (**Halliwell *et al.*, 1989**).

- L'initiation : réaction de formation des radicaux oxygénés,
- La propagation : réactions entre les radicaux oxygénés et les autres molécules formant de nouveaux radicaux avec amplification de la chaîne réactionnelle,
- La terminaison : réactions entre radicaux libres (dismutation ou combinaison) ou formation d'un radical libre particulièrement stable.

Les hydroperoxydes lipidiques formés sont dégradés principalement en isoprostane, acide thiobarbiturique, malonedialdéhyde (MDA) et 4-hydroxynonéal (4-HNE) (**Chaudhary *et al.*, 1996**; **Chen *et al.*, 1996**) qui réagissent de manière covalente avec les protéines et les inactivent. Ce sont des produits très toxiques (mutagènes) qui réagissent également avec l'ADN, les protéines et sont impliqués dans les mécanismes apoptotiques (**Ramakrishnan *et al.*, 1993**; **Marnett *et al.*, 1999**). Le MDA et le 4- HNE sont utilisés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (**Figure 21**) (**Rudolf *et al.*, 2015**).

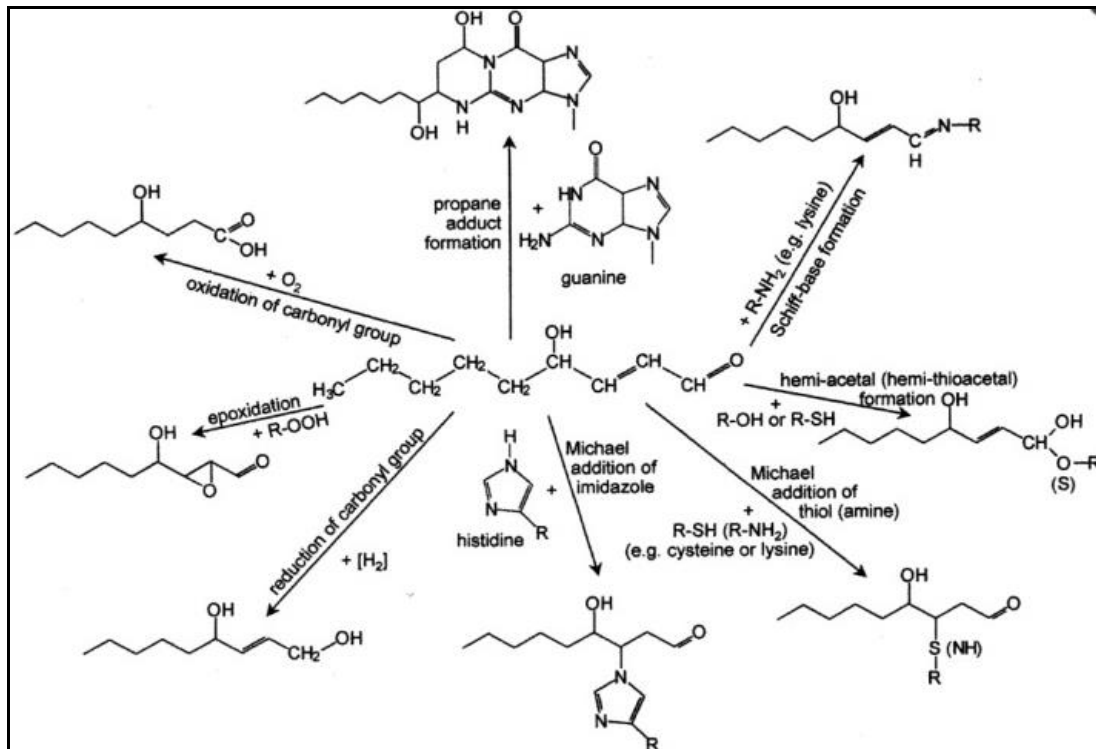


Figure 21: Interaction du 4-hydroxynonéal (4-HNE) avec différentes biomolécules

(Rudolf et al.,2015).

La peroxydation de lipides qui est une conséquence importante du stress oxydant induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes. Ceci devrait donc des conséquences importantes sur les flux ioniques impliqués dans la conduction de l'influx nerveux.

Oxydation des protéines

Les protéines sont susceptibles d'être oxydées par les ROS conduisant à la modification de leurs qualités physico-chimiques, de leur localisation et structure et donc au changement ou à la perte de leurs activités biologiques (Levine et al., 2002; Henrotin et al., 2003). Lors du processus oxydatif des protéines, les composés carbonylés se forment très tôt. La carbonylation des protéines signifie l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine par rupture des liaisons peptidiques ou par addition de produits issus de la peroxydation lipidique (formation d'une double liaison entre un atome de carbone et un atome d'oxygène (fonction cétone $>C=O$ ou aldéhydes $-CH=O$)) (Peng et al., 2000; Levine et al., 2002). Les protéines les plus susceptibles de former des carbonyles sont celles riches en acides aminés basiques (lysine, arginine et histidine). Ce type de modification est souvent catalysé par des métaux de transition comme Fe^{2+} ou Cu^{2+} pouvant se fixer sur les protéines et ainsi faciliter l'attaque de H_2O_2 ou même du dioxygène directement (Reznick et al., 1994). L'OH \cdot et l'ONOO \cdot sont les

radicaux les plus réactifs avec les protéines. L' $O_2^{\bullet-}$ est le moins réactif des ROS mais est suffisamment fort pour oxyder les groupements thiols (-SH) de la cystéine (**Halliwell et al., 2008**) menant à la formation de groupements sulféniques (-SOH), sulfoniques (-SOOH), sulfoniques (SOOOH) ou à la formation de ponts disulfures (-S—S-) entre deux cystéines. La méthionine peut également être oxydée en sulfoxyde de méthionine (>S=O) ou en sulfone de méthionine (-S(=O)(=O)-) (**Raman et al., 2011**). Le radical tyrosyle issu de l'oxygénation de la tyrosine (ajout de groupements hydroxyde -OH) peut réagir avec $O_2^{\bullet-}$ pour former l'hydroperoxyde de tyrosine (oxygénation du cycle) (**Halliwell et al., 2008**). Par ailleurs, à cause de la variété d'acides aminés, les protéines peuvent être modifiées selon plusieurs autres modalités autre que l'oxydation de leurs chaînes latérales comme la nitration (l'attachement d'un groupe $-NO_2$ au niveau des acides aminés aromatiques) (**Alcaraz et al., 2013**), la nitrosylation (l'attachement d'un groupe $-NO$ à un résidu thiol (S-nitrosylation) ou à un métal (M-nitrosylation)) (**Halliwell et al., 2008**) ou encore la chlorination (l'attachement de l'hypochlorite $HOCl/ClO^-$ avec le groupement amines ($-NH_2$)) (**Olszowski et al., 2003**). Les ROS sont aussi capables d'arracher les hydrogènes liés au carbone α de la chaîne polypeptidique et créer ainsi des radicaux libres centrés sur le carbone, qui peuvent à leur tour enchaîner de nouvelles réactions radicalaires ce qui aboutit à la fracture de la chaîne polypeptidique ou encore à la formation de liaisons inter-chaînes et/ou intra-chaînes. Certains aldéhydes issus de la peroxydation lipidique, principalement le 4 HNE, peuvent également être ajoutés à la chaîne sur les acides aminés en situation de stress oxydant (**Valko et al., 2007; Halliwell et al., 2008**). Les radicaux oxygénés participent également à la régulation des canaux ioniques. Comme les canaux sodium et calcium, les canaux K^+ sont aussi cibles directe ou indirecte du stress oxydative. Ainsi les radicaux oxygénés peuvent agir sur la séquence peptidique ou sur les voies qui régulent la transcription génique, le trafic, le turnover et la dégradation (**Matalon et al., 2003**).

Récemment, plusieurs études soutiennent que la modulation des canaux K^+ est le principal mécanisme sous-jacent à la perte de la fonction neuronale aussi bien lors du processus pathologique de nombreuses maladies « channelopathies », le vieillissement ou dans le cas des maladies neurodégénératives (**Tableau 2**) (**Sesti et al., 2010**).

Tableau 2. Modifications Oxydatives des canaux ioniques (Sesti et al., 2010)

Channel	Oxidative modification	Physiological role
HERG	Accelerate activation/deactivation	Heart remodeling?
Kv1.5	Accelerate activation, right shift in voltage activation, current increase	May be involved in initiation or perpetuation of atrial fibrillation.
ShakerB/C	Slow down inactivation	?
Kv7.2, Kv7.4, Kv7.5	Enhance current	Cytoprotection and neuronal silencing during hypoxia
Kv1.4	Slow down inactivation	?
Kv1.x-Kv β	Slow down inactivation	?
A-type K ⁺ channel in rat DRG neurons	Slow down inactivation	Adjustment of pain sensitivity?
Kv1.7	Accelerate inactivation	?
BK	H ₂ O ₂ eliminates physiological activation	?
SK	Methionine oxidation upregulates channel activity	Modulates mitochondrial ROS production in neutrophils, thereby favoring the function of these cells as anti-inflammatory
K _{ATP}	H ₂ O ₂ activates K _{ATP} activity	Insulin, dopamine release
Na _v	Thiol oxidizers inhibit sodium currents. Methionine oxidation slows down inactivation	?
L-type calcium channel	Oxidation of -SH groups alters gating	?
CLC-0	Alters inactivation gating	?
CLC-1	Promotes the formation of a functional dimer	?

Les radicaux oxygénés ou les produits qu'ils génèrent pourraient ainsi influencer la fonctionnalité des canaux ioniques et affecter par conséquent la transmission de l'influx nerveux.

Domage des acides nucléiques

Les acides nucléiques (ADN ou ARN) sont très sensibles au stress oxydant. La plupart des ROS sont capables de réagir avec aussi bien les bases azotées (puriques et pyrimidiques) que le ribose et le désoxyribose. L'attaque radicalaire directe peut entraîner l'oxydation des bases en particulier la guanine (**Alcaraz et al., 2013**), créer des sites abasiques par rupture des liaisons entre la base purique ou pyrimidique et le désoxyribose ou attaquer directement le désoxyribose pour créer des ruptures simples ou doubles brins (**Favier, 2003**). Les produits de la peroxydation lipidique, particulièrement le 4-HNE, peuvent également interagir avec les bases azotées pour former des adduits (**Favier, 2003**). L'attaque radicalaire cible aussi les protéines en contact avec l'ADN comme les histones, les enzymes ou les facteurs de réplication et de transcription entraînant la formation des pontages entre les protéines avec les bases azotées. Ainsi, différents pontages tyrosine-thymine ou entre les autres acides aminés et la thymine ou la cytosine ont été identifiés (**Dizdaroglu et al., 1989; Nackerdien et al., 1991**).

Le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (**Richter et al., 1988**). Ainsi, des taux élevés de ROS pourraient engendrer des mutations du génome mitochondrial codant pour quelques sous-unités de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (sept sous-unités du

complexe I, une du complexe III, trois du complexe IV et deux de l'ATP synthase), ce qui pourrait exacerber la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire et induire ainsi une augmentation progressive des mutations du génome mitochondrial et des protéines synthétisées (**Beckman et al., 1998**). Les fonctions de la mitochondrie sont donc particulièrement exposées aux dommages oxydatifs provoquant principalement une diminution de la synthèse d'ATP mais aussi engageant la cellule dans un programme de mort cellulaire.

1.4. Rôles du stress oxydant dans la maladie d'Alzheimer

Le vieillissement diminue la capacité des cellules à compenser le déséquilibre biologique provoqué par les radicaux libres. Il diminue les défenses antioxydantes et augmente la production des radicaux (**Finkel et al., 2000**). Le cerveau est plus sensible aux dommages oxydatifs en raison des niveaux élevés en acides gras polyinsaturés, des niveaux relativement élevés d'ions de métaux de transition, et de sa forte consommation d'O₂ (**Butterfield et al., 2007**). Cette surcharge de radicaux libres est caractéristique de plusieurs maladies neurodégénératives liées à l'âge telles que la MA, la maladie de Parkinson ou encore la DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age) (**Whitehead et al., 1995; Sies et al., 1997; Polidori et al., 2001; Esposito et al., 2002; Haleng et al., 2007; Aliev et al., 2008**). Les ROS sont élevés au niveau de régions cérébrales présentant des altérations histopathologiques sévères ; leurs niveaux corrèlent bien avec la gravité des symptômes associés à la MA (**Rao et al., 2002; Hardy et al., 2002; Mattson et al., 2014**). En parallèle, des taux réduits d'antioxydants (par exemple acide urique, vitamine C et E) ou d'enzymes antioxydantes (SOD, catalase) ont été identifiés chez des patients MA (**Wang et al., 2014**). Il n'est pas encore possible de préciser si les dommages cellulaires liés au stress oxydant représentent un facteur primaire initiant la maladie ou s'ils constituent un événement secondaire suite à l'agrégation de l'A β et/ou à la formation de DNF. En effet, plusieurs études ont montré que l'A β est capable d'induire la production des ROS par les différents mécanismes comme le rôle catalytique des métaux fer, cuivre, zinc et aluminium (**Atwood et al., 1998**), la peroxydation lipidique (**Canevari et al., 2004**), le dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (**Casley et al., 2002; Reddy et al., 2005**). L'hyperphosphorylation de Tau augmente également le stress oxydant par le biais des protéines kinases (**Lovell et al., 2004**). Les ROS participent aussi indirectement à la formation des plaques amyloïdes par l'activation des cellules gliales (**Abramov et al., 2004**). Ils stimulent la transcription des gènes pro-inflammatoires et induisent la libération de cytokines, telles que les interleukines IL-1, IL-6,

et TNF- α , et les chimiokines neuro-inflammatoires. L'implication du stress oxydant dans la MA est soutenue par les importantes altérations des lipides, des protéines et acides nucléiques. La peroxydation des lipides est associée aux premiers stades de la MA (**Williams et al., 2006**). Des produits de la peroxydation lipidique à savoir le MDA, le peroxy-nitrite, et les carbonyles ont été détectés dans les cerveaux de patients Alzheimer en particulier au niveau des DNF (**Christen et al., 2000**). Les adduits 4-HNE, de type 4-HNE-Histidine ou 4-HNE-Lysine, ont été décrits au niveau du cerveau des patients (**Montine et al., 1997; Fukuda et al., 2009**). De plus, l'intermédiaire endopéroxydé du docosahexaénoïque acide (DHA) (F₄-NeuroPs) ou celui de l'acide arachidonique (F₂-IsoPs) sont retrouvés à des concentrations élevées dans le LCR des patients Alzheimer (**Montine et al., 1998**). Ceci est associé à une atrophie corticale évaluée postmortem (**Montine et al., 1999**). De même, les niveaux d'isomères NeuroP étaient significativement élevés dans la zone néocorticale, spécifiquement le gyrus temporal supérieur et moyen, le lobe pariétal inférieur et dans la région occipitale (**Nourooz-Zadeh et al., 1999; Reich et al., 2001**). Les niveaux totaux des isomères IsoP et NeuroP ne sont pas significativement corrélés avec la classification de Braak (**Reich et al., 2001**). Certains oxystérols issus de l'auto-oxydation du cholestérol ont été associés à la MA et à plusieurs autres maladies ; ceci a conduit à évoquer l'utilisation des oxystérols comme biomarqueurs de pathologies neurodégénératives (**Leoni et al., 2011; Wang et al., 2016**) (l'auto-oxydation du cholestérol ainsi que leur implication dans la MA sera plus détaillée dans la partie 2.1).

Dans le cas de la MA, les protéines peuvent subir des attaques radicalaires autres que la formation des adduits. Ainsi, plusieurs protéines de la régulation du métabolisme énergétique, du système antioxydant, de l'activité protéosomique (UCH-L1), du cytosquelette (tubuline et actine) et de la signalisation cellulaire sont modifiées par oxydation dans le cerveau des MA (**Hoyer et al., 2004; Sultana et al., 2006; Reed et al., 2008; Opii et al., 2008; Aluise et al., 2011; Butterfield et al., 2002; Tramutolaa et al., 2016**). L'oxydation des canaux K⁺ par ROS pourrait être une cause principale neurodégénérescence. Particulièrement, pour la MA les canaux BK sont responsables de la perte de l'activité postsynaptique observée dans la région CA1 de l'hippocampe de souris modèles de la MA (TgCRND8) (**Ye et al., 2008**). En outre, il a été montré que l'A β module multiples type de canaux K⁺ tels que Kv1, Kv4 et Kv3 (**Good et al., 1996; Chung et al., 2001**). De ce fait, multiples courants K⁺, indispensables à l'excitabilité neuronale, sont éventuellement régulés, par la surproduction des ROS surproduits pendant l'étiologie de la MA.

L'évaluation quantitative des dommages oxydatifs des bases nucléiques a montré une augmentation du taux de pyrimidines ou purines oxydées, avec une proportion élevée de 8oxoG, dans les cerveaux et le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de MA (**Gabbita et al., 1998 ; Lovell et al., 1999**). Ces altérations sont retrouvées dans les lymphocytes et plus généralement les leucocytes de patients (**Morocz et al., 2002 ; Migliore et al., 2005**).

2. Métabolisme lipidique

2.1. Métabolisme du cholestérol

Le cholestérol présent dans les organes, provient de la capture du cholestérol circulant apporté par l'alimentation (absorption intestinale) et de la synthèse de novo majoritairement hépatique (**Repa et al., 2000**). Au niveau du cerveau, la barrière hémato-encéphalique (BHE) limite le passage du cholestérol plasmatique circulant. Moins de 1 % du cholestérol périphérique passe la BHE (**Bjorkhem, 2006**). La quasi totalité du cholestérol cérébral est donc synthétisée de novo. Dans le cerveau, le cholestérol est majoritairement présent sous forme libre puisque plus de 99,5 % du cholestérol est non estérifié. Il se distribue au sein des membranes des cellules neuronales et gliales, et dans la gaine de myéline formée par les oligodendrocytes (**Gibson et al., 2003; Dietschy et al., 2004**). L'homéostasie du cholestérol est principalement maintenue par le contrôle de l'équilibre entre la synthèse de novo du cholestérol, les dépenses et l'élimination.

La synthèse de novo du cholestérol est essentiellement assurée par les astrocytes. Le cholestérol synthétisé est nécessaire à la croissance neuritique (**Handelmann et al., 1992; de Chaves et al., 1997; Hayashi et al., 2004; Funfschilling et al., 2012**), à une synaptogenèse optimale et à l'activité synaptique (**Barres et al., 2001; Mauch et al., 2001**). Un taux de cholestérol stable est nécessaire au bon fonctionnement de l'exocytose des vésicules synaptiques (**Linetti et al., 2010**).

Dans les conditions physiologiques, la capacité de synthèse du cholestérol par les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes) est au moins trois fois supérieure à celle des neurones (**Koper et al., 1984; Saito et al., 1987; Bjorkhem et al., 2004**). La présence de précurseurs du cholestérol, tels que le lathostérol et le desmostérol, dans les lipoprotéines issues des astrocytes suggèrent que les astrocytes sécrètent des précurseurs qui seraient absorbés par les neurones puis convertis en cholestérol (**Mutka et al., 2004; Wang et al., 2008**).

La réaction de synthèse du cholestérol implique une succession de réactions enzymatiques.

Cette synthèse complexe nécessite 18 molécules d'acétyl-CoA, 18 d'ATP et 29 de NADPH par molécule de cholestérol formée (**Shobab et al., 2005**). La synthèse se fait à partir de la condensation de trois molécules d'Acétyl Coenzyme A qui conduit à la formation de mévalonate et d'HMG-CoA par l'intermédiaire de l'HMG-CoA réductase. Cette enzyme est une enzyme clé dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol. Les inhibiteurs d'HMG-CoA réductase ont été très étudiés dans la MA.

Les étapes de synthèse sont généralement scindées en deux, les étapes pré- et post-lanostérol (**Figure 22**). Le lanostérol, composé stéroïde en C30, est le premier stérol produit. Il provient de la cyclisation du squalène en présence d'O₂, de NADPH et de H⁺ après une série de condensations du mévalonate jusqu'à la formation du farnésyl-pyrophosphate. La condensation de deux farnésyl-pyrophosphates par la squalène synthase donne le squalène, qui est ensuite époxydé par la squalène oxydase puis cyclisé en lanostérol par la 2,3-oxydosqualène cyclase. Le farnésyl-pyrophosphate est un composé clé, il est à la fois le précurseur de voie du cholestérol et de celle des dolichols. La voie de synthèse de l'acétyl-CoA au lanostérol est appelée voie du mévalonate. Les deux voies parallèles de Bloch et Kandutsch-Russell conduit ensuite au cholestérol et à ses dérivés. Ainsi, le lanostérol est converti en cholestérol lors d'un processus complexe au cours duquel les doubles liaisons sont réduites, leurs positions sont modifiées, les trois groupements méthyles sont supprimés et un groupement hydroxyl est introduit (**Berg et al., 2002**, Biochemistry. 5ème édition., p. 974.). Dans de ces deux voies, les mêmes enzymes sont impliquées mais pas dans le même ordre, donnant naissance à des intermédiaires différents. La voie de Bloch permet la formation de desmostérol tandis que la voie Kandutsch-Russell conduit à la synthèse de 7-déhydrocholestérol (**Sharpe et al., 2013**). La voie Kandutsch-Russell est la voie principale dans la majorité des cellules de mammifères. Cependant, les oligodendrocytes semblent utiliser préférentiellement la voie Bloch (**Bjorkhem et al., 2004**).

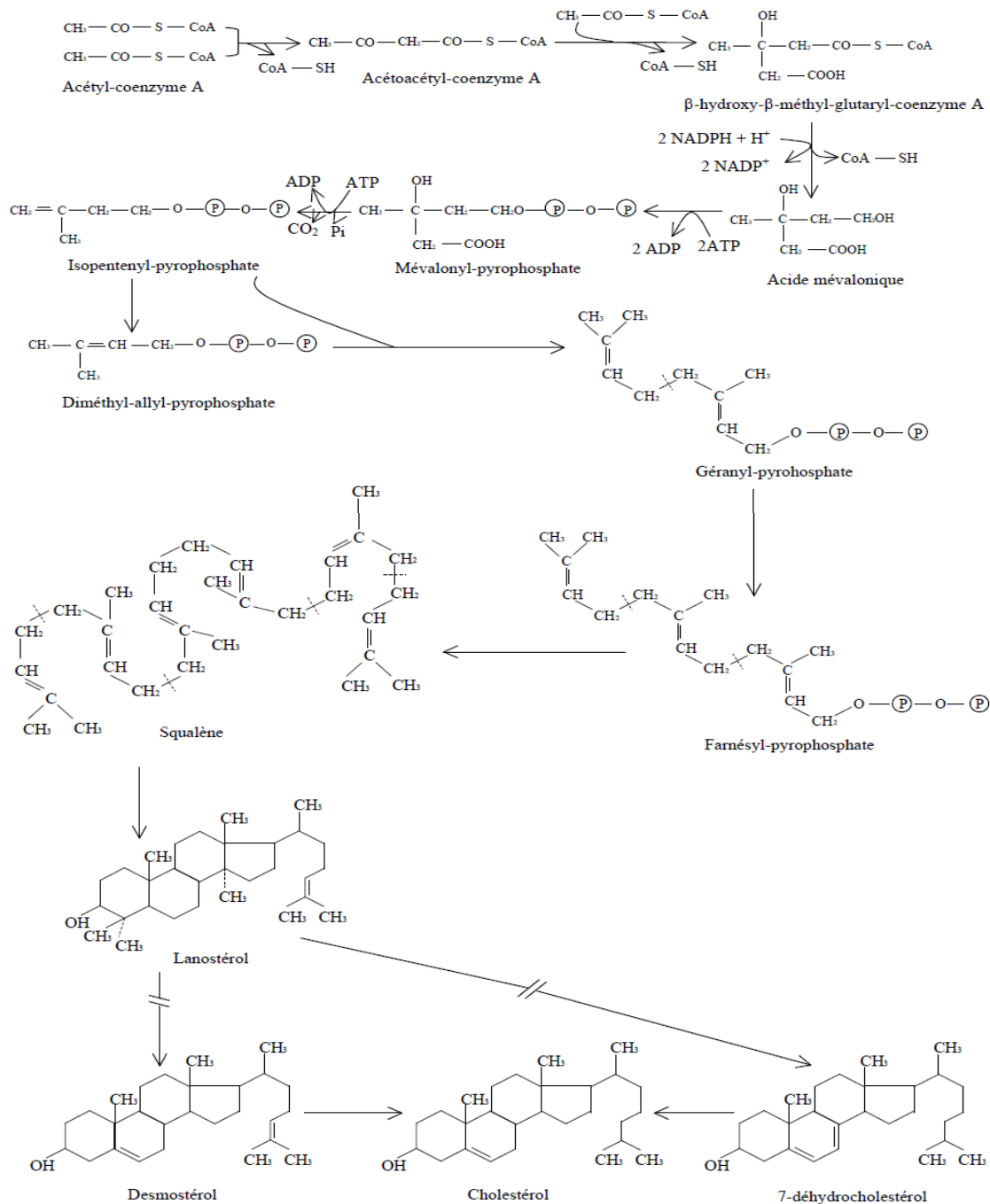


Figure 22: Principales voies de synthèse du cholestérol (Waterham *et al.*, 2000)

2.1.2. Élimination du cholestérol cérébral

L'excès du cholestérol intracellulaire, bien que présent en faible proportion, peut être estérifié par l'acétyl-CoA acétyltransférase, située dans le réticulum endoplasmique, ensuite stocké sous forme de gouttelettes lipidiques (Chang *et al.*, 2009). Le cholestérol est majoritairement sous forme libre dans le cerveau (Choi *et al.*, 1978; Johnson *et al.*, 1978). L'excès du cholestérol intracellulaire est majoritairement éliminé. Une petite partie du cholestérol en

excès peut être complexée aux lipoprotéines et éliminerer par l'intermédiaire des récepteurs ABCA1 (ABC pour « ATP Binding Cassette ») pour gagner le LCR puis la circulation sanguine en passant la BHE (Strazielle *et al.*, 2013). Le cholestérol pourrait également passer la BHE grâce aux transporteurs ABCA1 exprimés par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Gosselet *et al.*, 2009; Panzenboeck *et al.*, 2002).

La majorité du cholestérol en excès est éliminé après sa conversion en 24(S)-hydroxycholestérol (24S-OHC) par la cholestérol 24-hydroxylase (CYP46A1) (Figure 23), enzyme de 500 aa (~ 53 kDa) faisant partie de la famille des cytochromes P450 (Lundet *al.*, 1999). La voie CYP46A1 constitue la voie majoritaire d'élimination du cholestérol au niveau cérébral.

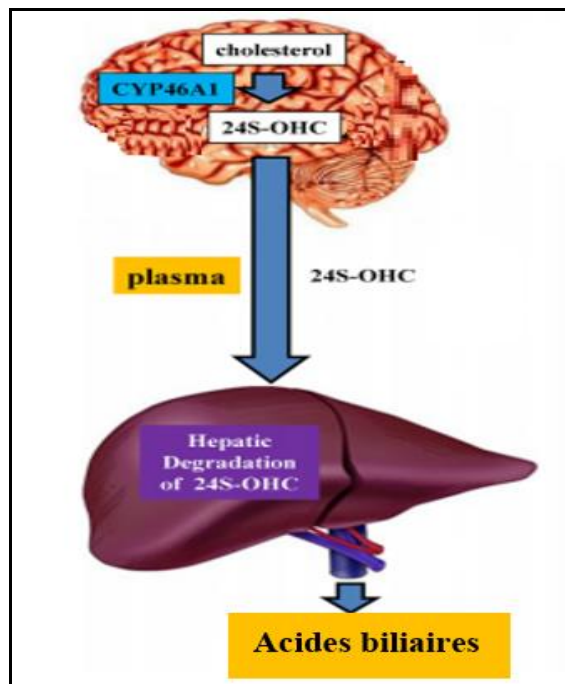


Figure 23: Elimination du cholestérol cérébral par conversion en 24S-hydroxycholestérol (Zarrouk *et al.*, 2015)

L'hydroxylation sur la chaîne latérale du cholestérol en position 24, le rend plus hydrophile et facilite sa translocation à travers les membranes phospholipidiques cérébrales. (Meaney *et al.*, 2002; Ohtsuki *et al.*, 2007). Lorsque la BHE est altérée, la concentration plasmatique en 24S-OHC augmente (Saeed *et al.*, 2014). La majeure partie du 24S-OHC présente dans le plasma provient du métabolisme du cholestérol cérébral qui est ensuite métabolisé par le foie à une vitesse à peu près égale à celle de sa production par le cerveau (~ 6-7 mg / jour) (Lutjohann

et al., 1996; Bjorkhem *et al.*, 1997). Le 24S-OHC est converti dans le foie en un composé 7 α -hydroxylé par l'enzyme CYP39A1 (Li-Hawkins *et al.*, 2000) puis métabolisé en acides biliaires (acide cholique et acide chénodésoxycholique) et en autres intermédiaires puis excrété dans la bile (Bjorkhem *et al.*, 2001; Russell *et al.*, 2009). Par ailleurs, des traces de 27-hydroxycholestérol (27-OHC), issu de la conversion du cholestérol par la 27-hydroxylase (CYP27A1), ont été détectées dans le cerveau. Cet oxystérol capable de traverser la BHE n'est produit au niveau cérébral qu'en faible quantité (Lund *et al.*, 2009).

2.2. Oxydation du cholestérol : les oxystérols

Les oxystérols (dérivés oxydés du cholestérol) sont formés soit grâce à des enzymes spécifiques, qui appartiennent à la famille des enzymes à cytochrome P450 (Russell *et al.*, 2000) ou par auto-oxydation sous l'effet d'espèces réactives de l'oxygène ou de radicaux libres (Smith *et al.*, 1989). Les oxystérols peuvent également provenir d'aliments riches en cholestérol, en particulier d'aliments industriels sujets à oxydation au cours du processus de fabrication et pendant le stockage. L'oxydation du cholestérol génère des groupements hydroxy-, céto- ou époxy (Figure 24).

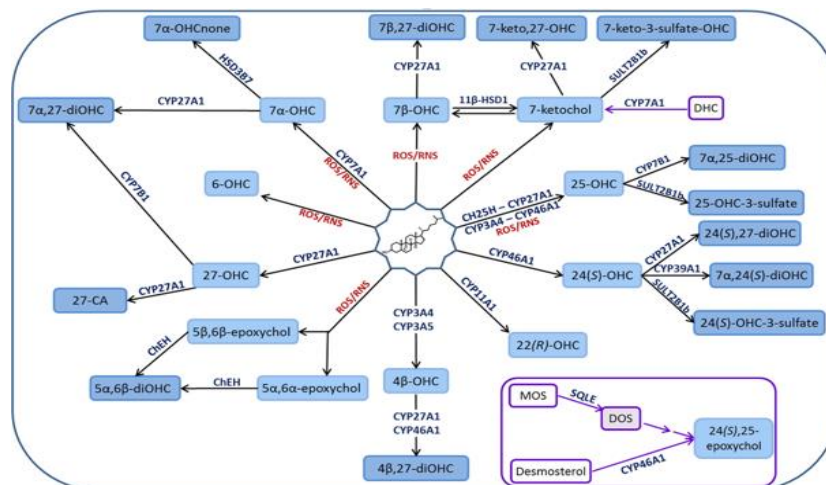


Figure 24: Formation des dérivés oxydés du cholestérol ou oxystérols

(Mutemberezi *et al.*, 2016)

Les dérivés oxydés ainsi formés diffèrent en fonction du site d'oxydation. On distingue d'une part les oxystérols avec un site d'oxydation au niveau de la structure stéroïde et d'autre part les oxystérols oxydés sur la chaîne latérale. Par exemple, l'oxydation peut impliquer la double liaison entre les carbones 5 et 6, produisant du cholestérol 5,6 α ou 5,6 β -époxy, ou le carbone en position 7 donnant du 7 α -hydroxycholestérol (7 α -OHC) ou du 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC) en fonction de l'orientation du groupement hydroxyle ou encore du 7-cétocholestérol

(7KC) (Szuchman *et al.*, 2003). Le 4 α -hydroxycholestérol et le 4 β -hydroxycholestérol sont aussi détectés dans le plasma humain (Breuer *et al.*, 1996). L'oxydation de la chaîne latérale du cholestérol génère le 24S-OHC, le 25-hydroxycholestérol (25-OHC) et le 27-hydroxycholestérol (27-OHC); en position 22, on aura du 22S-hydroxycholestérol ou du 22R-hydroxycholestérol.

2.2.1. Oxydation enzymatique

La synthèse enzymatique des oxystérols a été abordée pour la première fois en 1956 (Fredrickson *et al.*, 1956) par l'identification du 25-OHC et du 27-OHC dans une fraction enrichie en mitochondries. Depuis, de nombreux oxystérols issus du catabolisme du cholestérol par différentes hydrolases de type cytochromes P450 (CYP P450) ont été identifiés. Les oxystérols 24S-OHC, 27-OHC, 25-OHC, 7 α -OHC et 4 β -hydroxycholestérol, sont synthétisés par différentes enzymes respectivement par la 24-hydroxylase (CYP46A1), la 27-hydroxylase (CYP27A1), la 25-hydroxylase, la 7 α -hydroxylase (CYP7A1) et la CYP3A4 (Tableau 3).

Tableau 3. Enzymes impliquées dans la synthèse d'oxystérols.

24S-OHC: 24S-hydroxycholestérol; 25-OHC: 25-hydroxycholestérol; 27-OHC: 27-hydroxycholestérol; 7 α -OH: 7 α -hydroxycholestérol; 4 β -OH: 4 β -hydroxycholestérol; 7 β -OH: 4 β hydroxycholestérol

Enzyme	Distribution cellulaire	Localisation cellulaire	Oxystérol formé
CYP24A1	Neurones, Rétine neurale, Hépatocytes, surrénales	RE	24S-OHC
25-hydroxylase	Hépatocytes, Macrophages,	RE, Golgi	27-OHC
CYP27A1	Hépatocytes, Macrophages, Cellules endothéliales	mitochondrie	25-OHC
CYP7A1	Hépatocytes, Cellules ovariennes	RE	7 α -OH
CYP3A4	Hépatocytes	microsomes	7 β -OH

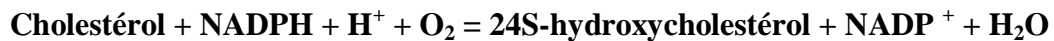
Ces enzymes sont plus ou moins spécifiques de chaque type d'oxystérol synthétisé (Schroepfer *et al.*, 2000).

24S-hydroxylase ou CYP46A1

La 24S-hydroxylase (CYP46A1) permet l'hydroxylation en position 24S du cholestérol grâce à son activité monooxygénase. Cette enzyme est exclusivement exprimée par les neurones du cortex cérébral, l'hippocampe, le gyrus denté, le putamen et le thalamus. Elle été également

identifiée au niveau des cellules ganglionnaires de la rétine (**Lund et al., 2003 ; Bretilion et al., 2007**). L'induction d'expression de CYP46A1 par les cellules gliales a été montrée chez des patients atteints de MA (**Bogdanovic et al., 2001**).

CYP46A1 est ancrée dans la face externe du réticulum endoplasmique (**Black et al., 1992**). La cristallographie par diffraction des rayons X a permis de mettre en évidence la structure de CYP46A1. Elle comprend 12 hélices α et 4 feuilletts β plissés et un groupement hème contenant un atome de fer réduit ($\text{Fe}^{3+} + e^- = \text{Fe}^{2+}$), positionné entre deux hélices α et lié à la cystéine 437. CYP46A réalise la réaction d'oxydo-réduction suivante :



La suppression de cette enzyme diminue le taux du 24S-OHC de 98 % dans le cerveau et de 75 % dans le sérum et réduit la synthèse de cholestérol de 40 % alors que le taux de cholestérol cérébral n'est pas altéré. La cholestérol 24S-hydroxylase est donc responsable de 40 % du renouvellement du cholestérol (**Lund et al., 2003**). Cette réduction relativement forte suggère que les neurones exprimant CYP46A1 induisent le renouvellement du cholestérol dans le cerveau (**Lund et al., 2003**). De plus, les souris déficientes en CYP46A1 ont un efflux du cholestérol cérébral réduit d'environ deux tiers (**Xie et al., 2003**). CYP46A1 permet également (mais à un niveau beaucoup plus faible) la formation de 25- hydroxycholestérol (**Lund et al., 1999**).

27-hydroxylase ou CYP27A1

La 27-hydroxylase, appelée aussi CYP27A1, est localisée dans la membrane interne des mitochondries (**Björkhem et al., 2002**). Cette enzyme catalyse l'hydroxylation en position 27 du cholestérol. Au niveau hépatique, CYP27A1 catalyse l'étape initiale de la β -oxydation de la chaîne latérale du cholestérol en vue de la formation des acides biliaires à 24 carbones en transformant le 27-OHC en 3 β -hydroxy-5-cholesténoïque (**Chiang et al., 1998**). CYP27A1 catalyse également l'addition d'un groupement hydroxyl sur plusieurs autres substrats stéroïdes autre que le cholestérol tels que les intermédiaires de la voie de synthèse des acides biliaires comme le 5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α -triol et le 5 β -cholestane-3 α ,7 α -diol pour produire leurs formes hydroxylées en position 27. Dans les tissus extra-hépatiques, CYP27A1 contribue à l'élimination du cholestérol intracellulaire en excès sous forme de 27-OHC (**Russell et al., 2000**). Le 27-OHC est aussi un puissant suppresseur de la biosynthèse du cholestérol (**Russell et al., 2000**). Dans le cerveau, le 27-OH est transformé en 7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholénoïque (7-OH-4-C) par l'enzyme CYP7B ; 7-OH-4-C traverse la BHE pour être éliminé par le foie

(**Björkhem et al., 2009**). La majorité du flux passe de la circulation vers le cerveau avec un efflux quotidien d'environ 5 mg / 24 h (**Heverin et al., 2005**). La concentration du 27-OHC dans le LCR est significativement corrélée avec celle du plasma (**Leoni et al., 2003**). Ce flux dépendant de l'intégrité de la BHE. Lorsque celle-ci est endommagée, la concentration cérébrale en 27-OHC augmente (**Leoni et al., 2003; Leoni et al., 2004; Heverin et al., 2005**). CYP27A1 catalyse aussi moins la formation du 24S-OHC et du 25-OHC (**Lund et al., 1993**).

25-hydroxylase

La synthèse du 25-OHC est principalement médiée par la 25-hydroxylase (qui n'est pas une enzyme à cytochrome P450) par addition d'un groupement hydroxyl en position 25. Cette enzyme appartient à la famille des désaturases et des hydroxylases à motif tripartite au niveau du site actif (**Russell et al., 2003**). Elle est exprimée dans la plupart des tissus à des niveaux faibles ; elle est localisée au niveau du réticulum endoplasmique (**Lund et al., 1998**). La concentration hépatique du 25-OHC est assez faible par rapport à celle des tissus ce qui suggère que la production des acides biliaires et la métabolisation de l'excès intracellulaire du cholestérol n'est pas l'inducteur principal de la synthèse du 25-OHC. Par ailleurs, il a été montré que le 25-OH a une fonction cruciale dans le contrôle de l'immunité (**Bauma et al., 2009**). Le 25-OHC est un puissant suppresseur de la synthèse des stérols, plus puissant que le cholestérol, dans les cellules en culture par le contrôle de la synthèse des SREBP (Sterol Response Element Binding Protein) (**Lund et al., 1998**).

Autres enzymes impliquées dans la synthèse d'oxystérols

Parmi ces enzymes il faut considérer CYP11A1 impliquée dans la formation du 22(R) hydroxycholestérol (**Nelson et al., 1981**). L'enzyme microsomale, la 7 α -hydroxylase ou CYP7A, qui catalyse la transformation du cholestérol en 7 α -hydroxycholestérol (**Ogishima et al., 1987**). Il a également été démontré que le 4 β -hydroxycholestérol est majoritairement formé par oxydation du cholestérol sous l'action de CYP3A4 (**Bodin et al., 2001**).

D'une façon générale, l'oxydation enzymatique du cholestérol contribue au maintien de l'homéostasie du cholestérol dans l'organisme en facilitant l'élimination de l'excès du cholestérol intracellulaire. Les oxystérols peuvent ensuite être métabolisés en acides biliaires dans le foie. Ainsi, le 27-OHC et le 25-OHC sont hydroxylés par la 7-hydroxylase (CYP7B1) en composés 7-hydroxylés métabolisés en acides biliaires (**Russell, 2000**). Les oxystérols peuvent également être métabolisés en hormones stéroïdes ou en d'autres stérols

(Schroepfer, 2000).

Des aminoalkyls tels que la dendrogénine A ont été décrits (Khalifa *et al.*, 2014). Ce sont des composés enzymatiques résultant de la conjugaison du 5,6-époxycholestérol et de l'histamine (De Medina *et al.*, 2013). D'autres oxystérols sont formés par une voie parallèle à la voie du cholestérol post-lanostérol en particulier le 24,25-époxycholestérol formé par cyclisation du dioxyde de squalène (Luu, 1995). La caractérisation structurale et la quantification de ces oxystérols particuliers produits *in vivo* est souvent difficile.

La mesure des oxystérols est difficile car ces derniers sont présents en faible quantité (concentration physiologique : environ 0,01 - 0,1 M dans le plasma ; cholestérol : environ 5000 M). Par ailleurs, le cholestérol est sujet à autoxydation ce qui peut générer des artéfacts (Schroepfer, 2000). La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ou la chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse sont les méthodes les plus fiables.

2.2.2. Auto-oxydation

Le cerveau est l'organe le plus riche en cholestérol et contient 25 % du cholestérol de l'organisme. Il n'est pas donc surprenant qu'il contienne beaucoup d'oxystérols quand il est le siège d'une rupture de l'équilibre RedOx.

L'auto-oxydation du cholestérol aboutit principalement à la formation du 7-KC, du 7 α -OHC ou du 7 β -OHC, des époxydes 5,6 α et 5,6 β et du cholestanetriol (Brown, 2009). Le carbone 7 du cholestérol est le plus vulnérable à une attaque radicalaire. En présence de cuivre le 7 α -OHC peut être converti en 7KC. Le 7KC est le principal oxystérol issu de l'auto-oxydation du cholestérol, il constitue un bon marqueur du stress oxydant (Dyer *et al.*, 1997). L'époxydation du cholestérol en position 5 est à l'origine de la formation des 5,6-époxycholestérols. Le 5,6 β -époxycholestérol est exclusivement formé par autoxydation. Le 5,6 α époxycholestérol est à la fois formé par voie enzymatique et synthétisé par autoxydation (Patel *et al.*, 1996). Ces derniers sont des composés instables ; une fois produits, ils sont hydroxylés en cholestanetriol (Chang *et al.*, 1997).

2.2.3. Oxystérols et régulation de l'efflux du cholestérol : Récepteurs nucléaires LXR

Les oxystérols sont capables de moduler l'homéostasie lipidique en interagissant avec les récepteurs LXR (Liver X receptors). Ces récepteurs contrôlent l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol (Joseph *et al.*, 2002). Les récepteurs LXR sont

d'importants composants d'un système régulateur complexe qui anticipent les niveaux de cholestérol et modifient par conséquence l'expression de gènes (Lund *et al.*, 2003). Les acides gras polyinsaturés (AGPI) inhibent l'action prolipogène des LXR, notamment comme inhibiteurs compétitifs des oxystérols (Yoshikawa *et al.*, 2002). Les oxystérols agissent notamment sur les enzymes du métabolisme du cholestérol (HMG-CoA synthase et autres enzymes de la synthèse du cholestérol) via des facteurs de transcription nucléaires tels que la famille des SREBP (sterol responsive element binding protein).

Deux isoformes LXR- α et - β ont été identifiées et sont connues pour être activées *in vitro* par les oxystérols. LXR- α possède une expression restreinte aux organes viscéraux, intestin, foie, rein, rate mais également dans les macrophages. Contrairement à LXR- α , LXR- β est exprimé de manière ubiquitaire à des niveaux faibles dans tous les tissus. Les deux isoformes de LXR, LXR- α et LXR- β sont exprimées dans le SNC, LXR- β est 2 à 5 fois plus important dans le cerveau par rapport au niveau retrouvé dans le foie. Les niveaux de LXR dans les neurones en culture et la glie sont respectivement de 2 % et 17 % ceux du foie, tandis que les niveaux de LXR- β sont respectivement de 110 % et 380 % ceux du foie (Whitney *et al.*, 2002). Les oxystérols sont les principaux ligands de LXR. Les ligands les plus efficaces de l'isoforme α sont ceux oxydés sur la chaîne latérale tels que le 22R-OHC, le 20S-OHC, le 25-epoxycholestérol, le 24S-OHC, le 25-OHC ainsi que le 27-OHC (Janowski *et al.*, 1999; Ory *et al.*, 2004). Quant au 7-KC, au 7 α -OHC, et au 7 β -OHC ce sont des ligands moins efficaces des LXR (Janowski *et al.*, 1999). Les récepteurs LXR forment des hétérodimères fonctionnels avec RXR (Retinoid X Receptor). Cette régulation transcriptionnelle varie en réponse à différents ligands (Edwards *et al.*, 2002). Ce complexe LXR/RXR est appelé hétérodimère permissif car il peut être activé ou inhibé par les ligands de LXR ou de RXR. Les hétérodimères LXR α /RXR- α et LXR- β /RXR- α se lient à une séquence LXRE (Figure 25).

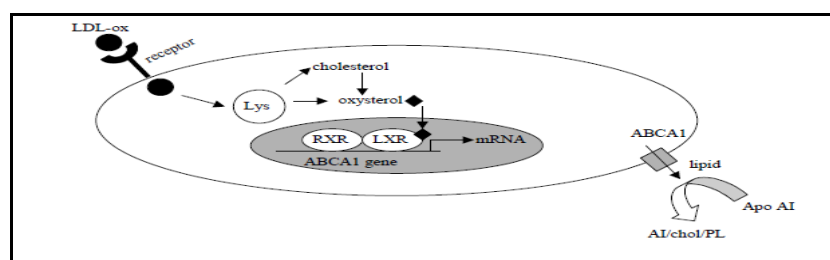


Figure 25: Modèle de régulation de l'efflux du cholestérol par LXR en réponse à une charge en oxystérol. LDL-ox : LDL oxydées; Lys : lysosome (Venkateswaran *et al.*, 2000)

Les récepteurs LXR contrôlent l'expression de protéines qui permettent la sécrétion de cholestérol cellulaire telles qu'APOE et le taux de protéines de la famille des ATP-binding cassettes (ABC) et plus particulièrement ABCA1, ABCG1, ABCG5 et ABCG8 impliquées dans le transport du cholestérol vers la membrane plasmique pour son appariement aux lipoprotéines formant les lipoprotéine de haute densité (HDL) et son export vers le foie (**Gelissen et al., 2006 ; Zhao et al., 2010**). L'activation de LXR par les oxystérols inhibe également la transcription de deux gènes cholestérogéniques codant pour la farnésyl-diphosphate farnésyl transférase (FDFT1) et la lanostérol 14 α -déméthylase (CYP51A1) (**Wang et al., 2008**). Ces récepteurs sont également des régulateurs de CYPs notamment pour la CYP46A1. L'excès de 24S-OHC excrété des neurones via ABCG1 et ABCG4 peut être recapté par les astrocytes où il régule la synthèse de cholestérol et celle d'ApoE via LXR (**Pfrieger et al., 2003; Abildayeva et al., 2006**).

De nombreuses études suggèrent des relations entre l'activation de LXR et la MA. En effet, les gènes cibles des LXR codent des protéines ayant des rôles critiques dans le développement et la progression de la MA comme ceux réglant le catabolisme du cholestérol et l'inflammation (NO synthase inductible, IL-1 β , IL-6, COX-2 (cyclo-oxygénase 2), MMP-9 (métallo-protéinase 9)) (**Edwards et al., 2002; Tontonoz et al., 2003; Ory et al., 2004**). Les données génétiques ont aussi montré que les individus en bonne santé et portant l'isoforme ApoE4, fortement associé à la MA, développent des plaques amyloïdes ; cela a conduit à suggérer un rôle important des LXR dans la clairance d'A β (**Walker et al., 2000 ; Reiman et al., 2009**). Les LXR sont aussi capables de moduler le clivage protéolytique de l'APP. En effet, les agonistes de LXR (22 (R)-hydroxycholestérol ou T0901317) augmentent à la fois l'expression d'ABCA1 et la sécrétion d'A β dans les cellules Neuro2A (**Fukumoto et al., 2002**). L'augmentation de la production de l'A β était probablement médiée via ABCA1 : l'ARNsi ciblant ce transporteur a diminué le taux d'A β produit et l'agoniste de LXR (T0901317) améliore l'expression d'ABCA1 et diminue la production d'A β (**Koldamova et al., 2003**). Des études plus récentes ont montré que les agonistes de LXR sont capables d'améliorer les capacités mnésiques des animaux (**Donkin et al., 2010; Vanmierlo et al., 2009; Fitz et al., 2010 ; Sodhi et al., 2014**). Etant donné que l'activation de ces gènes facilite la clairance du peptide amyloïde, des agonistes de LXR sont proposés comme approche thérapeutique potentielle pour la MA.

2.2.4. Action des oxystérols sur la membrane plasmique

A côté des phospholipides, le cholestérol constitue le principal composant des membranes

biologiques où il représente 20 à 25 % des molécules lipidiques (**Mukherjee et al., 1998**). Il est également abondant dans les endosomes et l'appareil de Golgi, particulièrement dans le trans-Golgi (**Mukherjee et al., 1998**).

La structure du cholestérol lui confère des propriétés biophysiques particulières comme le fait d'augmenter la cohésion et le regroupement des lipides avoisinants ce qui entraîne une diminution de la perméabilité et de la fluidité membranaire.

Au niveau de la membrane cellulaire, le cholestérol adopte une association préférentielle avec les sphingolipides formant des microdomaines enrichis en cholestérol et en protéines utiles pour la transduction du signal, le trafic membranaire, et l'adhésion cellulaire (**Simons et al., 1998; Balasubramanian et al., 2007; Viola et al., 2007**). Le ratio cholestérol / phospholipides régule donc la structure physique des membranes et certains processus cellulaires (**Brown et al., 1999; Tabas, 2002**).

Il est également démontré que le cholestérol est impliqué dans de nombreuses activités biologiques et voies de signalisation cellulaire. Le cholestérol module l'activité de nombreuses protéines présentes dans les membranes, soit de manière non spécifique en influençant la dynamique membranaire (**Ohvo-Rekila et al., 2002; Lee et al., 2004**), soit de manière spécifique en interagissant directement avec les protéines et/ou les ligands de ces protéines (**Hua et al., 1996; Addona et al., 1998**). Le cholestérol est aussi nécessaire pour une bonne conduction de l'influx nerveux. Il représente 4/10 des lipides constituant la myéline et contribue à sa fonctionnalité (**Bjorkhem et al., 2004**). En effet, la myéline est un complexe contenant 70 % de lipides (**Bjorkhem et al., 2004; Taylor et al., 2004**). Elle est composée en plus de cholestérol, de glycosphingolipides, de galactolipides et de plasmalogènes dans un rapport molaire 2:2: 1:1 (**Bjorkhem et al., 2004**). Le cholestérol est également un précurseur de neurostéroïdes (**Baumann et al., 2001; Jahn et al., 2009**).

Ayant une structure proche de celle du cholestérol, les oxystérols peuvent s'insérer dans les bicouches lipidiques des membranes cellulaires mais d'une manière distincte de celle du cholestérol (**Figure 26**). Selon leurs origines, enzymatique ou non, l'orientation des oxystérols dans les membranes n'est pas la même. Les oxystérols avec le groupement oxydé sur leur chaîne latérale présentent deux groupements polaires à leurs extrémités et adoptent une orientation horizontale à l'interface membranaire. En revanche, les oxystérols oxydés au niveau du carbone 7 comme le 7KC et le 7 β -OH s'orientent d'une façon verticale dans la membrane vu que les deux groupements hydrophiles sont du même côté. Cette configuration particulière des oxystérols d'origine enzymatique favorise le détachement du cholestérol et

augmente la perméabilité membranaire (Olsen *et al.*, 2012) ce qui pourrait moduler l'activité des protéines membranaires associées (Schroepfer, 2000). En raison de leur hydrophilie considérablement accrue (les oxystérols sont plus hydrophiles que le cholestérol), les oxystérols se déplacent plus rapidement entre les membranes des organelles intracellulaires et accèdent facilement aux récepteurs cytosoliques (Yan *et al.*, 2008). Le 7KC pénètre dans les radeaux lipidiques et module la fonction et la répartition des protéines entre les domaines membranaires (Berthier *et al.*, 2004; Rentero *et al.*, 2008).

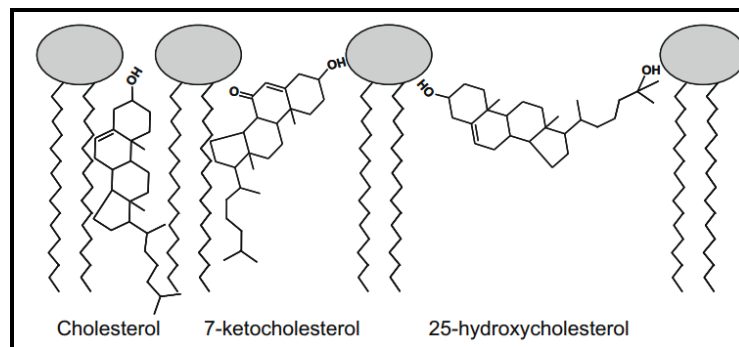


Figure 26: Représentation schématique de l'orientation membranaire du cholestérol, du 7KC et du 25-OHC (Olkkonen *et al.*, 2009)

2.2.5. Activités cytotoxiques des oxystérols

La cytotoxicité des oxystérols dérivés soit de l'oxydation enzymatique ou d'auto-oxydation suscite beaucoup d'intérêt. Plusieurs études suggèrent que l'enrichissement en oxystérols peut jouer un rôle important dans la pathophysiologie de nombreuses pathologies à différents niveaux et même les potentialiser. Certains oxystérols testés sur de nombreuses lignées cellulaires d'origine nerveuse sont capables d'activer l'apoptose, la nécrose, la nécroptose, l'autophagie, le stress oxydant et/ou l'inflammation,... (Guardiola *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1999; Schroepfer, 2000; Martinet *et al.*, 2004; Noguchi *et al.*, 2014). Les effets néfastes des oxystérols sont principalement caractérisés par : surproduction de ROS, stress du réticulum endoplasmique, peroxydation lipidique, accumulation de lipides neutres et polaires, altération de la mitochondrie / lysosome / peroxysome (Pedruzzi *et al.*, 2004; Prunet *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Vejux *et al.*, 2008; Vejux *et al.*, 2009). Dans le contexte des maladies neurodégénératives, la mort cellulaire, neuronales ou gliales est accompagnée par une libération du cholestérol. Comme la conversion du cholestérol en 24S-OHC est la voie principale du relargage du cholestérol, la toxicité de ce métabolite a été évaluée dans le contexte de nombreuses maladies neurodégénératives comme la MA, la sclérose en plaques,

la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington (**Kölsch et al., 2004; Bretillon et al., 2007; Solomon et al., 2009; Leoni et al., 2013**). Le 24S-OHC est toxique sur les cellules de neuroblastome humain SK-N-BE et SH-SY5, les oligodendrocytes murins 158N, les cellules Jurkat (**Kölsch et al., 1999; Nury et al., 2015; Zarrouk et al., 2015**).

En cas de rupture de la BHE, le 27-OHC s'accumule dans le SNC (**Björkhem et al., 2006**). Le traitement des neuroblastomes différenciés SK-N-BE avec du 27-OHC et du 24S-OHC aux concentrations détectées chez les patients Alzheimer aboutit à une surproduction d'A β ₁₋₄₂. Le 27-OHC stimule la production d'APP et l'activation de la β -secrétase dans les SH-SY-5Y, les SK-N-BE et les cellules épithéliales de rétine (**Prasanthi et al., 2009; Gamba et al., 2014**). Le 7KC, 7 β -OHC et 25-OHC sont également toxiques sur les cellules neuronales PC12, les cellules neuronales sympathiques en culture et les cellules microgliales et interagissent avec A β (**Chang et al., 1998; Phan et al., 2013**). Le 7-KC et 7 β -OHC sont capables d'induire la mort cellulaire dans les SK-N-BE, les 158N et les microglies murines BV-2 (**Ragot et al., 2011; Zarrouk et al., 2015; Debbabi et al., 2016**). Le 7 α -OHC est aussi cytotoxique pour les SH-SY-5Y (**Kölsch et al., 2000**).

2.2.6. Oxystérols et pathologies neurodégénératives

Dans le cas de la MA, les recherches se sont majoritairement axées sur le taux cérébral et plasmatique du 24S-OHC, étant donné qu'il représente le métabolite principale du cholestérol, ainsi que sur le niveau d'expression de CYP46A1, enzyme responsable de la conversion du cholestérol en 24S-OHC, à différents stades de la maladie comparativement à des personnes âgées ne présentant pas des troubles cognitifs (**Figure 27**).

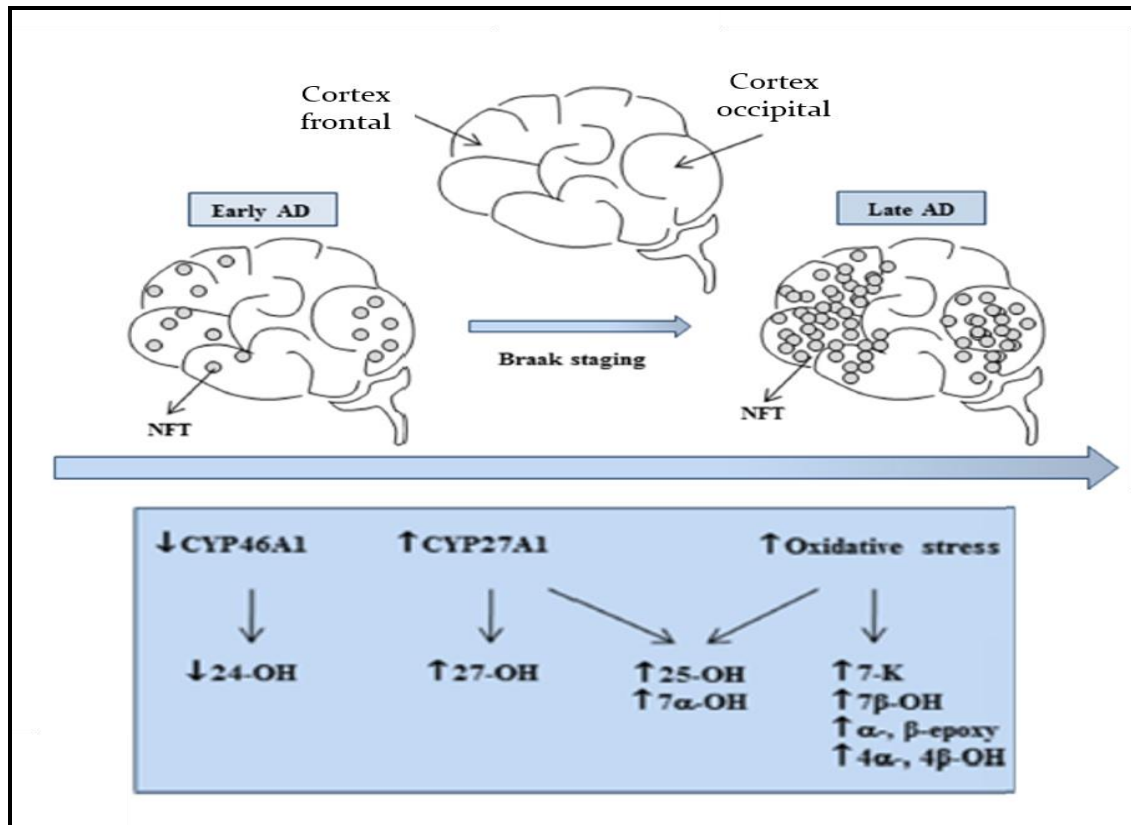


Figure 27: Implication des oxystérols lors de la progression de la maladie d'Alzheimer

(Testa *et al.*, 2016)

L'expression de cette enzyme est plus intense autour des plaques amyloïdes (Brown *et al.*, 2004). Les récentes méta-analyses suggèrent que les polymorphismes de CYP46A1 pouvaient être associés à un risque accru de développer la MA. Les polymorphismes de CYP46A1 sont associés à un dysfonctionnement cognitif accru et à un volume hippocampique diminué (Fu *et al.*, 2009; Hanggi *et al.*, 2011). Li *et al.*, (2010) ont aussi montré que le risque de développer la MA est associé à deux polymorphismes du promoteur de CYP46A1 (Li *et al.*, 2010).

L'expression du CYP46A1 est restreinte aux neurones. Il a été montré chez les patients Alzheimer qu'elle est légèrement compensée par les cellules gliales ; elle diminue de 40 % dès les premiers stades de la maladie et de 80 % pendant les stades avancés ou chez des déments (Lund *et al.*, 1999; Bogdanovic *et al.*, 2001; Testa *et al.*, 2016). Les taux de 24S-OHC sont négativement corrélés avec le degré d'atrophie cérébral observé chez les patients atteints de MA (Bretilon *et al.*, 2000; Papassotiropoulos *et al.*, 2000; Solomon *et al.*, 2009). Ainsi, des concentrations plus élevées en 24S-OHC ont été détectées pendant de la déficience cognitive contre des concentrations plus faibles pendant les stades les plus avancés de la maladie (Heverin *et al.*, 2005; Testa *et al.*, 2016). La concentration de cet oxystérol est

proportionnelle à la masse de neurones métaboliquement actifs. Le 24S-OHC pourrait donc être utilisé comme un marqueur d'atrophie cérébrale chez des patients atteints de la MA (**Leoni et al., 2011**). CYP46A1 joue donc un rôle clé dans la régulation du métabolisme intracérébral du cholestérol dans la MA. Ce rôle est confirmé par les graves déficiences spatiale, associative et motrice chez les souris *Cyp46a1*^(-/-) (**Kotti et al., 2006**). Dans le même contexte, des souris transgéniques âgées surexprimant CYP46A1 ont de meilleures performances mnésiques que les souris sauvages du même âge (**Maioli et al., 2013**). De même, l'induction de l'expression de *Cyp46a1* dans l'hippocampe et le cortex est capable d'améliorer les performances mnésiques d'un modèle murin de pathologie.

Il est important de signaler que les oxystérols, contrairement au cholestérol, peuvent traverser la barrière hématoencéphalique (**Lütjohann et al., 1996; Leoni et al., 2003**). Le 24S-OHC peut passer librement à travers la BHE, la concentration de cet oxystérol dans le plasma reflète à la fois l'intégrité de la BHE, le niveau de conversion du cholestérol et sa métabolisation au niveau du foie (**Meaney et al., 2002**). En fait, des taux élevés de 24S-OHC ont été détectés dans le plasma des malades pendant les premiers stades de la maladie en conséquence de la destruction des membranes plasmiques et de la myéline (**Lütjohann et al., 2000; Zuliani et al., 2011**). Par ailleurs, les stades les plus avancés de la MA se caractérisent par une diminution du taux de 24S-OHC dans le plasma et le LCR (**Kölsch et al., 2004; Solomon et al., 2009; Leoni et al., 2013**). Plusieurs travaux associent la baisse de l'efflux du 24S-OHC à l'atrophie cérébrale plus particulièrement dans les régions du cerveau responsables des fonctions cognitives (**Koschack et al., 2009; Solomon et al., 2009**). 24S-OHC pourrait également jouer un rôle dans le développement d'autres maladies neurodégénératives. D'importants taux de CYP46A1 ont été retrouvés au niveau de la rétine chez les patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (**Bretillon et al., 2007**). Dans la sclérose en plaques, le taux plasmatique de 24S-OHC corrèle également avec le degré d'atrophie cérébrale (**Van de Kraats et al., 2014**). Des concentrations plus élevées en 24S-OHC ont été également mesurées dans le plasma et le LCR de patients avec la maladie de Parkinson (**Bjorkhem et al., 2009**). Cependant, une baisse progressive du taux plasmatique du 24S-OHC a été remarquée lors de la progression de la maladie de Huntington (**Leoni et al., 2014**).

Le 27-OHC, qui est l'oxystérol majeur produit par réaction enzymatique (CYP27A1) au niveau périphérique, semble lui aussi associé à la MA. Des taux élevés de cet oxystérol ont été détectés au niveau frontal et occipital chez les patients Alzheimer en association avec la

sévérité de la maladie (**Figure 21**) (**Heverinet et al., 2004; Gamba et al., 2014; Testa et al., 2016**). Le 27-OHC passe la BHE et s'accumule dans le SNC, mais le taux élevé du 27-OHC peut aussi être expliqué par l'augmentation du taux de CYP27A1 au niveau cérébral. En effet, le taux du CYP27A1 est 2,5 fois plus important chez les patients pendant les premiers stades de la MA et 4,5 fois plus important lors des stades les plus tardifs (**Testa et al., 2016**). En revanche, des taux moins importants de CYP27A1 et du 27-OHC ont été mesurés au niveau plasmatique (**Kolsch et al., 2004; Brown et al., 2004**).

Le ratio 27-OHC / 24-OHC jouerait un rôle clé dans le fonctionnement cérébral; ce ratio est plus important dans le cortex que dans les noyaux gris centraux ; il est modifié chez les patients Alzheimer (**Heverin et al., 2005**).

Dasari et al. (2010) ont montré que le 27-OHC est aussi associé à la DMLA. Cet oxystérol est non seulement capable d'induire un stress du réticulum, une activation de la caspase-12 et un stress oxydatif au niveau de l'épithélium pigmenté rétinien ; il augmente également le clivage, la production et l'accumulation du peptide A β dans des cellules épithéliales humaines de rétine (ARPE-19) (**Dasari et al., 2010**). Le taux de 27-OHC est aussi plus élevé dans le LCR de patients avec maladie de Parkinson (**Bjorkhem et al., 2009**).

Une étude récente a montré que le taux de certains oxystérols dérivant de l'auto-oxydation du cholestérol tels que le 7KC, le 7 α -OHC, le 7 β -OHC, le 4 β -OHC, le 5,6 α -epoxycholestérol et le 5,6 β -epoxycholestérol ou dérivant à la fois de l'auto-oxydation et de l'oxydation enzymatique du cholestérol tels que le 25-OHC et le 7 α -OHC augmentent au cours de la MA au niveau du cortex frontal et occipital (**Figure 21**) (**Testa et al., 2016**). Ces résultats sont en faveur d'une étude antérieure menée en 2009 par Hascalovici et al., qui ont prouvé que les concentrations du 7 α -OHC, 4 β -OHC, α - β -epoxycholestérol et 7KC sont plus élevées en cas de la MA et qu'elles sont relatives aux stades de la maladie (**Hascalovici et al. ; 2009**). Le 7KC et le 7 β -OH, sont fréquemment retrouvés au niveau du SNC dans les zones démyélinisées des maladies neurodégénératives. Ces deux oxystérols sont extrêmement toxiques en raison de leur accumulation et de l'absence de processus de métabolisation dans les cellules eucaryotes (en particulier pour le 7KC) (**Ghosh et al., 2016**); leur surproduction pourrait contribuer au développement des pathologies neurodégénératives et même les potentialiser. Le 7KC a été aussi identifié à forte concentration *post-mortem* dans des cerveaux de patients atteints de MA ainsi que dans le LCR de patients avec sclérose en plaques (**Diestel et al., 2003 ; Hascalovici et al., 2009**). Le 7KC a été identifié aussi dans les drusen de patients atteints de DMLA. C'est l'oxystérol identifié en quantité la plus importante

associé à la DMLA (Javitt *et al.*, 2009). Le 7KC été également retrouvé en forte concentration dans le plasma des patients atteints de maladie de Niemann-Pick et d’X-ALD (Jiang *et al.*, 2011; Nury *et al.*, 2017).

2.3. Métabolisme des acides gras

2.3.1. Approvisionnement cellulaire en acides gras

Les acides gras (AG) sont des acides carboxyliques formés par une chaîne aliphatique composée d’atomes de carbone leur conférant leur caractère lipophile avec un groupement carboxyle terminal. La plupart des AG présentent une chaîne aliphatique linéaire avec un nombre pair de carbones de 2 à 28. Rarement libres, les AGs sont le plus souvent sous forme estérifiée comme constituants majeurs des lipides complexes tels que les triglycérides et les phospholipides. Le projet LIPID MAPS (**LIPID Metabolites and Pathways Strategy**; <http://lipidmaps.org>) a développé un système de classification, de nomenclature et de représentation chimique des lipides (Fahy *et al.*, 2005). LIPID MAPS classe les lipides en huit catégories, elles-mêmes subdivisées en classes et sous-classes : les AG, les glycérolipides (triglycérides), les glycérophospholipides ou phospholipides, les sphingolipides, les stérols, les prénoles, les saccharolipides et les polyketides. Le cholestérol, dont nous avons décrit le métabolisme intracellulaire ci-dessus, fait partie des stérols.

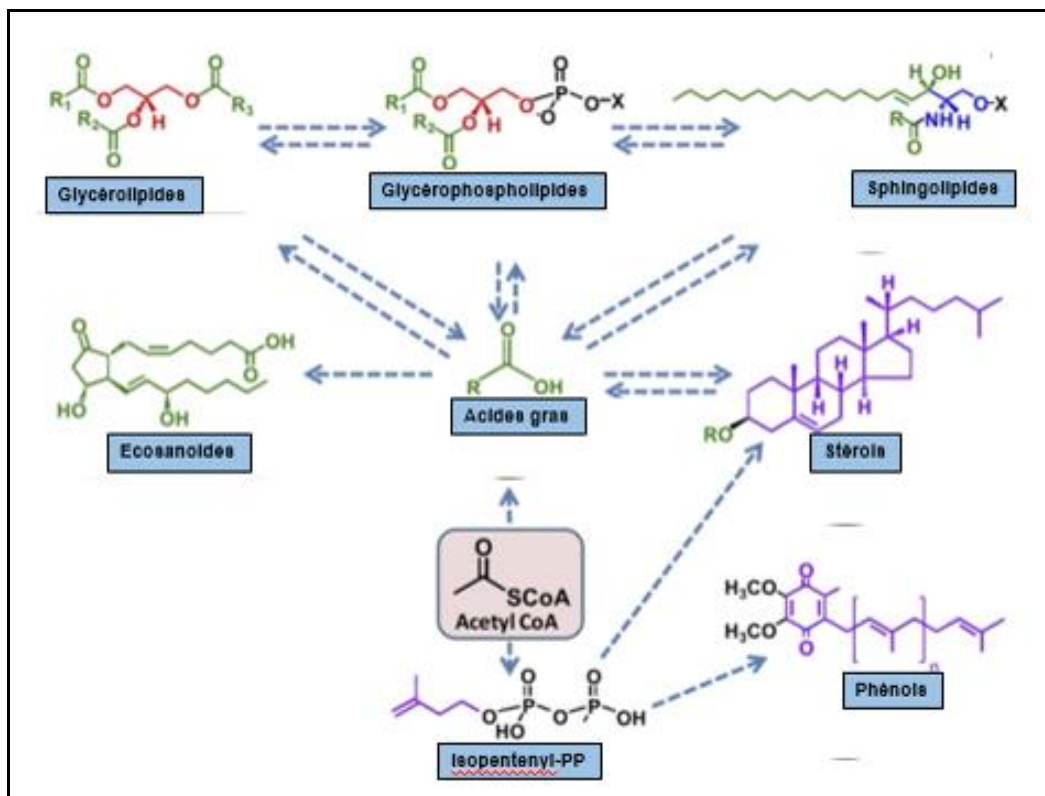


Figure 28: Diversité des lipides plasmatiques humains

Cette deuxième partie apporte des renseignements généraux sur les acides gras ainsi que sur leurs relations avec la MA.

Les AG peuvent être classés en deux catégories selon leur propriétés physicochimiques : les AG saturés et les AG insaturés, eux-mêmes répartis en deux sous groupes, les AG mono-insaturés et les acides gras poly-insaturés (AGPI) qui sont distingués selon la position des doubles liaisons sur la chaîne hydrocarbonée. Ils sont souvent définis par leur formule ou l'abréviation de leur nom (**Savary et al., 2012**).

Outre leur apport alimentaire, les AG peuvent être libérés par la dégradation des phospholipases ou synthétisés de novo. L'acide palmitique (C16:0) est le produit ultime de l'enzyme « FAS : fatty acid synthase ». Les autres acides gras sont ensuite formés par des réactions d'élongation et de désaturation catalysées par des élongases et des désaturases. Cependant, la machinerie enzymatique présente dans les cellules de mammifères ne peut pas introduire de double liaison en n-6 et n-3. L'acide linoléique (C18:2 n-6) et l'acide linoléique (C18:3 n-3) sont dit essentiels car leur présence dépend directement de l'apport alimentaire (**Whelan et al., 2006**). L'acide linoléique (C18:2 n-6) est le précurseur des acides gras n-6 et l'acide α -linoléique (C18:3 n-3) est le précurseur des AG n-3. Ainsi, l'acide linoléique (C18:2 n-6) est métabolisé en acide arachidonique (C20:4 n-6), précurseur des eicosanoïdes et principal AGPI de la famille des n-6. L'acide α -linoléique (C18:3 n-3) est converti en acide eicosapentaénoïque (EPA ; C22:5 n-3), puis en DHA (C22:6 n-3). Ces dérivés sont les principaux AGPI de la famille des n-3. La conversion de l' α -linoléique (C18:3 n-3), acide gras indispensable, en acide eicosapentaénoïque (EPA, C22:5 n-3) et en docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3) est une réaction lente avec un taux de conversion faible, ce qui rend indispensable leur consommation directe dans l'alimentation (poisson, produits de la mer). De plus, les neurones sont incapables de réaliser la synthèse *de novo* du DHA et doivent donc utiliser le DHA provenant du plasma ou synthétisé à partir des précurseurs par l'endothélium cérébral ou les astrocytes (**Williard et al., 2006**). En cas de carence en n-3, un AGPI n-6, l'acide docosapentaénoïque (DPA) est synthétisé pour remplacer le DHA.

Pour être métabolisé, les AG libres sont convertis en thioesters d'Acyl CoA par une Acyl-CoA synthétase. Les AG doivent tout d'abord franchir la membrane plasmique. L'importation des AG dans la cellule est assurée par 3 types de protéines. La FABP (FABP : Fatty Acid Binding Protein) agit comme récepteur des AG. La FAT/CD36 (Fatty Acid Transporter) joue un rôle dans la translocation des AG, la concentration des AG à la surface de la cellule et leur transfère aux FATP (Fatty Acid Transport Proteins) (**Coe et al., 1999; Stahl et al., 2001;**

Schaffer et al., 2002). Une fois dans la cellule, les AG sont activés par différentes Acyl-CoA synthétases qui catalysent l'activation des AG en thioesters d'Acyl-CoA. Les AG ou les thioesters d'Acyl-CoA peuvent alors participer à différents processus cellulaires notamment dans la composition des lipides cellulaires, le stockage du carbone sous forme de triacylglycérols, la régulation d'activités enzymatiques, la modulation de la transcription de certains gènes par activation de récepteurs nucléaires, de précurseurs d'hormones, de molécules de signalisation et de substrats pour les voies de l' α -, β - et ω -oxydation (**Sampath et al., 2005**).

2.3.2. Métabolisme des acides gras et Maladie d'Alzheimer

Actuellement, il est bien établi que l'altération du métabolisme des lipides est impliquée dans le développement et la progression de différentes maladies neurodégénératives. Chez les patients Alzheimer, une accumulation du C22:0 et d'AGTLCs (C24:0 et C26:0) a été observée pendant les stades V-VI selon la classification de Braak & Braak (**Kou et al., 2011**). Il a été supposé que cette accumulation d'acide gras, en particulier de C24:0 et de C26:0, pourrait être la conséquence de dysfonctions peroxysomales (diminution de β -oxydation peroxysomale) (**Lizard et al., 2012**). L'analyse des taux d'acides gras chez les déments a révélé une augmentation des niveaux du C26:0 dans les plasmas et les globules rouges ; une augmentation de la somme des AGPI et une baisse de la somme des AG mono-insaturés ont été également détectés dans les plasmas (**Zarrouk et al., 2014**). D'autres études ont révélé des taux de DHA cérébral inférieurs dans la MA, notamment le DHA libre dans l'hippocampe lieu de mémoire et d'apprentissage ; la baisse du DHA a été aussi observée au niveau hépatique et plasmatique (**Astarita et al., 2010; Zarrouk et al., 2015**). L'accumulation des AGTLC ainsi que la déplétion en plasmalogène et en DHA ont aussi été observées dans les maladies peroxysomales telles que l'X-ALD et la P-NALD (pseudo neonatal adrenoleukodystrophies) (**Janssen et al., 2003**). Des altérations du métabolisme des sphingolipides ont été aussi décrites dans la MA. Les taux de sphingomyéline et de céramide C18 sont corrélés aux taux d'A β et de la protéine Tau dans le LCR des individus ayant une prédisposition génétique à la MA (**Mielke et al., 2014**). Des niveaux accrus de céramides sont également présents dans le cerveau de patients atteints de la MA en comparaison aux sujets témoins de même âge (**Han et al., 2001; Filippov et al., 2012**). Il est important de noter que ses altérations se produisent dès les premiers stades de la MA (**Cutler et al., 2004**). En effet, des taux élevés en céramides ne sont observés que chez les patients présentant des symptômes légers à modérés (**Cutler et al., 2004**). Par ailleurs, des différences du niveau d'expression des

enzymes impliquées dans le métabolisme des sphingolipides ont été observées à différents stades de la MA. En particulier, ceux liés à la synthèse du céramide et à l'hydrolyse de la sphingomyéline sont augmentés en fonction de la progression de la maladie (**Katsel et al., 2007; Filippov et al., 2012**). Plusieurs études ont aussi décrit une réduction des niveaux de l'éthanolamine plasmalogène et de la choline plasmalogène dans les régions cérébrales et dans les érythrocytes de patients Alzheimer; cette réduction était positivement corrélée avec la sévérité de la maladie (**Igarashi et al., 2011; Kou et al., 2011**).

β -oxydation peroxysomale

La mitochondrie et le peroxysome sont les deux organites cellulaires responsables de la β -oxydation, principale voie de dégradation des acides gras (**Lazarow et al., 1976; Wanders, 2004**). Chacun de ces deux organites contient ses propres enzymes de β -oxydation codées par des gènes différents et qui se distinguent par leurs caractéristiques structurales et catalytiques (**Wanders et al., 2006**).

Selon leur nature physico-chimique, les AG sont oxydés préférentiellement dans l'un ou l'autre organite et cela souligne la complémentarité de ces deux voies de β -oxydation. Ainsi, selon la longueur de la chaîne carbonée, les AG à courte chaîne (< C6) et à chaîne moyenne (C6-C12) sont principalement oxydés dans la mitochondrie. Quant aux acides gras à longues chaînes (AGLC) (C12-C22), ils sont dégradés dans les mitochondries et les peroxysomes alors que les AGTLC saturés ou insaturés (AGTLC) (> C22) sont métabolisés exclusivement dans le peroxysome. Cependant, le peroxysome est incapable de dégrader complètement les acides gras qu'il prend en charge. En effet, des études métaboliques ont montré que la β -oxydation peroxysomale ne peut pas métaboliser un acyl-CoA d'une taille inférieure ou égale à huit carbones (octanoyl-CoA). Ce dernier doit être exporté vers la mitochondrie pour subir une β -oxydation complète (**Reddy et al., 2001**). A la fin de chaque cycle de β -oxydation peroxysomale, les AGTLC sont écourtés de deux atomes de carbones et l'acétyl-CoA libéré peut être transporté vers la mitochondrie et dégradé via le cycle de Krebs en CO₂ et H₂O. Outre les AGTLC, le peroxysome catabolise également l'acide pristanique provenant de l'alimentation et de l' α -oxydation de l'acide phytanique ainsi que les acides di- et trihydroxycholestanoïques et les acides dicarboxyliques à longue chaîne (**Wanders et al., 2006**).

Dans le cerveau, les AGTLC (C24:0 et C26:0) sont présents en quantité importante au niveau de la myéline en lui conférant ses propriétés d'isolation (**Ho et al., 1995**). Leur présence en excès peut déstabiliser la myéline (**Ho et al., 1995**) et être toxique pour les cellules nerveuses,

en particulier pour les oligodendrocytes (**Hein et al., 2008**). La dégradation des AGTLC est l'une des principales fonctions des peroxysomes. Par conséquent, une biogenèse peroxysomale ou une β -oxydation défectueuse aboutit à l'accumulation des AGTLCs dans le plasma et les tissus contribuant ainsi à la démyélinisation (**Geillon et al., 2012**).

Au niveau du peroxysome, l'incorporation des AGTLC dans la matrice peroxysomale dépend de la longueur de la chaîne. Ainsi, les AG à moyenne chaîne, sous forme activée en acyl-CoA, traversent de façon passive la membrane peroxysomale alors que les AGLC et les AGTLC sont transportés vers la matrice peroxysomale via les transporteurs ABC (« ATP Binding Cassette ») après hydrolyse d'une molécule d'ATP (**Rottensteiner et al., 2006**). Trois transporteurs ABC de la sous famille D (ABCD) assureraient le transport des AG dans la matrice peroxysomale : ABCD1, ABCD2, et ABCD3 (ou PMP70). Ce sont des protéines intégrales de la membrane peroxysomale (**Rottensteiner et al., 2006**). La voie de dégradation des AGTLC implique une cascade de 4 réactions enzymatiques : α/β déshydrogénation, hydratation (de la double liaison), déshydrogénation et clivage thiolytique. Ces réactions sont catalysées par l'acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1), l'énoyl-CoA hydratase/L-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (L-PBE) et la 3-cétoacyl-CoA thiolase inductibles par les activateurs des PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α) (**Hashimoto et al., 1996; Hashimoto et al., 2000; Reddy et al., 2001**).

Acide docosahexaénoïque (DHA)

Le DHA représente le plus long et le plus insaturé des AG retrouvé en quantité substantielle dans les tissus humains. La quantification des AG a permis de mettre en évidence la préférence des organes pour certains types d'acides gras chez l'humain. Le cerveau montre une sélectivité pour les AGPI à longues chaînes carbonées (> 20 carbones ; n-3 ou n-6) (**Soderberg et al., 1991**). Bien que le DHA soit présent dans tous les tissus et les types cellulaires avec une proportion qui dépasse pas en général 5 % des chaînes acyles des phospholipides, il est très présent dans le cerveau où il peut représenter jusqu'à 50 % des AG (**Breckenridge et al., 1972 ; Neill et al., 1973 ; Wiegand et al., 1983**). L'acide α -linoléique (C18:3 n-3) est le précurseur du DHA (C22:6 n-3) et de l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C22:5 n-3). Cet AG est apporté par l'alimentation. Il est présent en grande quantité dans les huiles végétales, notamment l'huile de colza, l'huile de lin ou l'huile de soja ainsi que dans la plupart des produits agricoles (**Whelan et al., 2006**). Une fois incorporé dans les cellules, l'acide α -linoléique (C18:3 n-3) est converti en EPA (C20:5 n-3), puis en DHA (C22:6 n-3). La synthèse du DHA à partir d'EPA, ne s'effectue pas directement et nécessite une élongation

de l'EPA en 24:5 n-3 qui sera ensuite désaturé en 24:6 n-3 par la Δ^5 -desaturase puis β -oxydé en DHA dans le peroxyosome. Une rétroconversion du DHA permet également la synthèse d'EPA (**Gronn et al., 1991; Conquer et al., 1997**).

Ces dérivés sont les principaux acides gras polyinsaturés (AGPI) de la famille des n-3. Toutefois, le pourcentage d' α -linoléique, acide gras indispensable, converti en DHA dans l'organisme humain est relativement faible (**Brenna, 2002; Burdge et al., 2005**), ce qui rend indispensable leur consommation directe dans l'alimentation (**Abedin et al., 1999**). De plus, les neurones sont incapables de réaliser la synthèse *de novo* du DHA et doivent donc utiliser le DHA provenant du plasma ou synthétisé à partir des précurseurs par l'endothélium cérébral ou les astrocytes (**Williard et al., 2001**). Le DHA et l'EPA sont présents dans les produits animaux principalement marins comme les algues et les poissons gras des eaux froides (maquereau, saumon, thon...). En effet, les huiles de poisson sont très riches en EPA et DHA et constituent la principale forme d'apport (**Whelan et al., 2006**). En cas de carence en n-3, un AGPI n-6, l'acide docosapentaénoïque (DPA) est synthétisé pour remplacer le DHA.

Le DHA (**Annexe 1**) s'élève à plus de 20 % des acides gras totaux du cerveau (**McNamara et al., 2006**). Il est particulièrement concentré dans les membranes cellulaires majoritairement dans la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine. Il est retrouvé en concentrations importantes au niveau des membranes excitables du cerveau ce qui lui confère un rôle fondamental dans la physiologie de ce tissu. Le DHA est un puissant modulateur de la fluidité membranaire (**Yehuda et al., 2002**). La résonance magnétique nucléaire (RMN), la diffraction à rayon-X et la modélisation moléculaire ont montré que les six doubles liaisons *cis* non conjuguées confèrent au DHA une très grande flexibilité par rapport aux acides gras saturés. Le DHA possède donc un grand nombre d'isomères possibles avec une vitesse de transition très élevée entre ces différentes conformations (**Feller et al., 2008; Gawrisch et al., 2008**). Par conséquent, une modification de la teneur en DHA affecte la flexibilité membranaire. Ces propriétés lui permettent de contrôler les différents systèmes de neurotransmission (systèmes mono-aminergique, cholinergique ou glutamatergique), induisant une modification dans la libération des neurotransmetteurs et d'assurer une bonne connexion entre les protéines telles que les enzymes, les récepteurs ou les canaux ioniques (**Fernstrom., 1999; Yehuda et al., 2002; Harbeby et al., 2002**).

Le DHA intervient aussi lors des situations inflammatoires, la diminution du taux de DHA cérébral entraîne une augmentation de l'expression des cytokines inflammatoires. Au contraire, une supplémentation en n-3 à longue chaîne permet d'inhiber la synthèse de ces

facteurs inflammatoires par les cellules microgliales (**Leray, 2013**).

Le DHA contrôle également le métabolisme lipidique. Ainsi, il a été montré *in vivo* qu'un régime alimentaire enrichi en huile de poisson entraîne des modifications de l'expression de gènes impliqués dans l'oxydation, la synthèse et le transport des lipides. Les récepteurs nucléaires et facteurs de transcriptions impliqués sont, entre autres, les PPAR, LXR/RXR et SREBP (**Kim et al., 1999; Lee et al., 2002**). Certaines études se sont plus particulièrement intéressées au rôle du DHA, sur le métabolisme cellulaire du cholestérol.

Médiateurs lipidiques dérivés du DHA

Le DHA est utilisé comme précurseur pour la synthèse de médiateurs bioactifs appelés docosanoïdes (composés de 22 atomes de carbone). Le DHA produit par oxydation enzymatique (12-LOX et 15-LOX) des résolvines, des neuroprostanes et des marésines (**Frisardi et al., 2011**). Les résolvines sont antagonistes des prostaglandines, leucotriènes et lipoxines, servant donc de puissants effecteurs anti-inflammatoires et immunorégulateurs. Ils ont aussi la capacité de bloquer la transcription d'IL-1 β et de réguler l'infiltration des leucocytes dans le cerveau (**Serhan et al., 2004**). Les neuroprostanes ont des propriétés anti-inflammatoires. Ils retardent l'infiltration des polynucléaires neutrophiles et inhibent l'expression des cytokines dans les cellules gliales (**Serhan et al., 2008**). L'activation des neuroprostanes inhibant aussi les voies de signalisation pro-apoptotiques par la stimulation des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (**Bazan et al., 2009**). Les neuroprostanes sont aussi des molécules anti-oxydantes, leur formation à partir du DHA est régulée par le statut redox des neurones. Ainsi, une induction de la production des neuroprostanes a été observée suite à l'augmentation du stress oxydant produit en présence du peptide A β , en cas d'hypoxie ou suite à l'activation d'IL-1 β . Ce dernier génère un puissant rétrocontrôle négatif sur le stress oxydant excessif. La présence d'un troisième médiateur du DHA, la marésine, a été décrite dans les macrophages. Cette dernière contrôle l'activation des macrophages. Leur présence dans les cerveaux normaux et atteints de MA n'a pas été décrite (**Serhan et al., 2008**).

Ainsi, pour surmonter les effets d'une carence en DHA, une supplémentation alimentaire en ce composé a été proposée pour prévenir les troubles de comportement et les pertes cognitives associées à certaines maladies neurodégénératives. En effet, un apport journalier de DHA et /ou d'AA ont montré que la vitesse de déclin du score MMSE (donc des fonctions cognitives) est plus faible chez les patients atteints d'une démence faible ou modérée comparativement aux patients placebo, alors que pour les patients souffrant d'une démence plus sévère la vitesse de déclin est plus importante (**Freund et al., 2006; Kotani et al., 2006; Cunnane et**

al., 2009; Cole *et al.*, 2010).

Sphingolipides

Les sphingolipides sont constitués d'une squelette sphingosine liée à un AG par une liaison amide –CO-NH₂. Trois types de sphingolipides sont décrits les *céramides*, les *phosphosphingolipides* et les *glycosphingolipides*. La sous-classe la plus abondante est celle des céramides. La sphingomyéline constitue le sphingolipide majeur des membranes des eucaryotes supérieurs et est particulièrement présente dans le SNC, puisqu'elle est le premier constituant de la myéline.

Bien que les sphingolipides ne représentent qu'une petite fraction des lipides cellulaires, les sphingolipides jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité structurale. En effet, la tête hydrophile et la queue hydrophobe des sphingolipides leur permettent de former une structure à double couche, connue sous le nom de bicouche lipidique. De plus, les différentes molécules issues de leur métabolisme régulent de nombreuses voies de signalisation et de processus biologiques dont la libération des neurotransmetteurs, la prolifération cellulaire ou l'apoptose (Colombaioni *et al.*, 2004). De plus, la perturbation de leur équilibre peut contribuer au développement de maladies neurodégénératives (Haughey *et al.*, 2010). L'examen post mortem du cerveau de patients décédés de la MA a mis en évidence un taux bas de sphingomyéline (sphingophospholipide) et un taux élevé de céramides, suggérant une implication de la conversion de la sphingomyéline dans cette pathologie (Soderberg *et al.*, 1992).

Le céramide, principal métabolite des sphingolipides, provient d'une synthèse *de novo* dans le réticulum endoplasmique par condensation de serine et de palmitoyl CoA, de l'hydrolyse de la sphingomyéline par des sphingomyélinases ou du recyclage des sphingosines. Le catabolisme de la sphingomyéline est la voie majoritaire (Bionda *et al.*, 2004). Après synthèse, les céramides rejoignent l'appareil de Golgi où ils seront glycosylés pour former les glycosphingolipides complexes, phosphorylés pour générer les céramides-1-phosphate ou être métabolisés en sphingomyéline par la sphingomyéline synthase (Bionda *et al.*, 2004).

Le céramide contrôle l'apoptose, mais aussi inhibe la croissance et la différenciation (Barcelo *et al.*, 2003). À des concentrations élevées, les céramides engendrent le déclenchement de l'apoptose (Mielke *et al.*, 2012). Des analogues de céramides à courte chaîne (C2-céramide et C6-céramide) ont été largement utilisés dans l'étude de la neurodégénérescence (Barth *et al.*, 2012).

Le céramide est capable d'initier des cascades de kinases, faisant intervenir les CAPK (CeramideActivated Protein Kinase), Ras, Raf-1, la voie des MAPKs, PKC- ζ , JNK/SAPK, c-Jun et les DAP kinases. Mais il active aussi des phosphatases, telles que les CAPP (Ceramide-Activated Protein Phosphatase), les phosphatases-1 (PP1) et les sérine/thréonine phosphatases-2A (PP2A), impliquées dans la survie ou l'apoptose (**Herr et al., 2001**). Le céramide serait alors impliqué, entre autres, dans l'activation de Bad (*Bcl-2 Antagonist of cell Death*) par déphosphorylation, dans l'inactivation de Bcl-2 ou d'Akt par déphosphorylation, dans la phosphorylation de p53, et dans l'expression de FasL, participant aux processus intrinsèques et extrinsèques de mort (**Herr et al., 2001; Ruvolo et al., 2003**). Ces activités semblent être modulées par différents acteurs tels que l'environnement lipidique, le stress oxydant, certaines kinases et protéases (**Liu et al., 1997; Marchesini et al., 2004**).

Dans le contex de la MA, le céramide peut stimuler la production d'A β par des mécanismes alternatifs (**Maja et al., 2015**). Ce dernier exerce un rétrocontrôle positif, les oligomères d'A β ainsi que sa forme fibrillaire induit une augmentation supplémentaire des taux de céramides par activant des sphingomyélinases (**Cutler et al., 2004**). De même, plusieurs épreuves démontrent que les céramides sont associée à plusieurs aspects pathologiques de la MA, notamment l'hyperphosphorylation de tau, génération de ROS, le dysfonctionnement mitochondrial, la dérégulation des voies de signalisation (**Maja et al., 2015**).

La sphingomyéline est un sphingophospholipide membranaire particulièrement présent dans la myéline. La sphingomyéline peut être synthétisée selon deux voies, la voie de Kennedy, associant un céramide avec la CDP-choline, et celle de Brady, dans laquelle la sphingophosphocholine est liée par une liaison amide à un AG à longue chaîne. L'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide et phosphocholine est catalysée par les sphingomyélinases (**Goni et al., 2002; Marchesini et al., 2004**). L'activation des sphingomyélinases et l'accumulation des céramides est le plus souvent stimulé par le stress ou à un signal pro-apoptotique (**Marchesini et al., 2004; Siskind et al., 2005**).

En effet, l'activation des sphingomyélinases a été rapportée après stimulation des récepteurs de mort cellulaire (**Chatterjee et al., 1999; Levade et al., 2002**). De nombreux rapports placent l'hydrolyse de la sphingomyéline en aval de l'activation de la caspase-8 consécutive à l'activation des récepteurs de mort cellulaire, mais en amont de l'activation des caspases effectrices comme la caspase-3 (**Levade et al., 2002; Cuvillier et al., 2003**). L'accumulation des céramides pouvant également résulter de l'activation de leur voie de biosynthèse ou d'une diminution de l'activité des enzymes SM synthase, glucosylcéramide synthase ou céramidase

(Bionda *et al.*, 2004 ; Birbes *et al.*, 2005). De nombreux autres rapports suggèrent un lien étroit entre l'activation des sphingomyélinases et le stress oxydant (Mattson *et al.*, 2005). Par exemple, des niveaux élevés de glutathion réduit semble influencer l'activation des sphingomyélinases *in vitro* et *in vivo* (Liu *et al.*, 1997). La surexpression de l'enzyme antioxydante glutathion peroxydase, de même que l'ajout d'ubiquinone ou de coenzyme Q10, induisent une diminution de l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide (Andrieu *et al.*, 2001). Cependant, le traitement des cellules par des donneurs d'oxyde nitrique augmentent l'activité des sphingomyélinases (Andrieu *et al.*, 2001). L'accumulation des céramides peut également résulter de l'activation de leur voie de biosynthèse ou d'une diminution de l'activité des enzymes sphingomyéline synthase, glucosylcéramide synthase ou céramidase (Bionda *et al.*, 2004; Birbes *et al.*, 2005).

Plasmalogènes

Les plasmalogènes (Annexe 1) constituent une classe particulière de glycérophospholipides membranaires caractérisée par la présence d'un vinyle éther lié à un AG saturé ou un AG mono-insaturé à la position *sn*-1 généralement soit l'acide palmitique (C16:0), l'acide stéarique (C18:0), ou l'acide oléique (C18:1), alors que la position *sn*-2 est estérifiée par un AG poly-insaturé à la position *sn*-2 (*sn* : numérotation stéréospécifique du squelette glycérol) comme l'acide arachidonique, l'EPA et le DHA (Akoh *et al.*, 1990; Kikuchi *et al.*, 1999; Zemski *et al.*, 2004). La tête polaire des plasmalogènes en position *sn*-3 est généralement estérifiée par une éthanolamine ou par une choline. Des études ont également montré que les plasmalogènes-PE seraient impliqués dans le métabolisme du DHA et agiraient comme des réservoirs d'acides gras polyinsaturés (Gaposchkin *et al.*, 1999; Nagan *et al.*, 2001).

La genèse de la liaison vinyle éther est strictement peroxysomal (Hardeman *et al.*, 1989; Singh *et al.*, 1993). Les deux premières étapes de la biosynthèse des plasmalogènes ont lieu dans le peroxysome puis la synthèse se poursuit dans le RE et les réactions finales de synthèse des plasmalogènes ont lieu dans le cytosol (Wanders *et al.*, 2006). Dans le peroxysome, la première étape consiste à estérifier le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) avec un acyl-coA à longue chaîne grâce à l'enzyme dihydroxyacétone phosphate acyltransférase (DHAP-AT). La deuxième étape transforme l'acyl-DHAP en alkyl-DHAP grâce à l'enzyme alkyl-dihydroxyacétone phosphate synthase (ADHAP-S) (Brites *et al.*, 2004).

Les fonctions des plasmalogènes seraient liées à la réactivité chimique particulière de leur fonction éthervinylique (Gorgas *et al.*, 2006). Bien que ses rôles physiologiques ne soient pas complètement élucidés, ils semblent jouer des rôles dans la dynamique membranaire,

lasignalisation cellulaire, le métabolisme et le transport du cholestérol, la lutte contre les oxydants et le métabolisme des acides gras polyinsaturés (AGPI) (Zoeller *et al.*, 1988; Gaposchkin *et al.*, 1999; Zoeller *et al.*, 1999; Nagan *et al.*, 2001; Maeba *et al.*, 2003; Kuczynski *et al.*, 2006). De plus éthanolamine plasmalogènes est l'élément structural de base de la myéline (Brites *et al.*, 2004).

3. Altération de l'homéostasie ionique intracellulaire

La teneur intracellulaire en Na^+ et en K^+ est critique pour les activités électrophysiologiques et d'autres processus cellulaires. Il a été suggéré qu'un déséquilibre de ces ions se produit dans le cerveau des patients Alzheimer. Cependant, les épreuves réelles de l'altération de l'homéostasie ionique intracellulaire, particulièrement celles de Na^+ et de K^+ dans le processus de développement et de progression des maladies neurodégénératives, sont limitées. Récemment, une évaluation quantitative des modifications de l'homéostasie des ions Na^+ et K^+ dans le cerveau des patients Alzheimer a été mise en oeuvre (Mellon *et al.*, 2009; Vitvitsky *et al.*, 2012; Graham *et al.*, 2015). L'imagerie de Na^+ par résonance magnétique (RM) a montré une corrélation très élevée entre le taux du Na^+ au niveau de l'hippocampe et le stade de la MA ; ceci est inversement corrélé avec le volume hippocampique (Mellon *et al.*, 2009). Vitvitsky *et al.* (2012) ont également montré une augmentation de la concentration du Na^+ au niveau du cortex frontale et pariétale. Le niveau élevé du Na^+ dans le cortex pariétal est corrélée avec le stade de Braak; l'augmentation du Na^+ a été décrite chez les patients atteints par la formes sévères de la MA, alors que cette altération n'été pas indiquée dans les formes modérées de la MA (Vitevitsky *et al.*, 2012). Aucune modification n'a été identifiée dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et dans les érythrocytes (Vitevitsky *et al.*, 2012; Roberts *et al.*, 2016).

Des taux plus élevés de K^+ ont été détectés au niveau du cervelet, cependant des taux plus faibles ont été détectés dans le cortex pariétal et frontal chez les patients Alzheimer pendant les stades précoces mais pas pendant les stades avancés de la maladie (Vitevitsky *et al.*, 2012; Graham *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2016). Au niveau du cortex pariétal, K^+ et Na^+ étaient positivement corrélés à la charge en $\text{A}\beta$ et au pH de la région frontale (Graham *et al.*, 2015).

Plusieurs hypothèses ont été suggérées pour expliquer cette surcharge en K^+ et Na^+ . Il a été rapporté que la MA est associée à une suppression de l'activité ATPase, une augmentation de l'apport de Na^+ dépendante du taux intracellulaire de Ca^{2+} (Colvin *et al.*, 1991; Hattori *et al.*, 1998). La diminution de la production d'énergie liée à la MA a suscité beaucoup d'intérêt. Une

diminution du métabolisme du glucose dans le cerveau de MA a été identifiée ce qui reflète une modification du gradient ionique transmembranaire régulé par Na^+ / K^+ ATPase. Une modulation de l'expression de la sous unité α de la Na^+ / K^+ ATPase a été décrite chez les patients Alzheimer ; l'expression de l'isoforme α_3 est significativement diminuée, alors que celle d' α_1 est augmentée. Par conséquent, la présence de l'isoforme α_3 pourrait être un facteur de prédisposition pour la MA (**Chauhan et al., 1997; Bacopa et al., 1998**). La fixation des plaques amyloïdes à la sous unité α_3 active les canaux calcium voltage dépendant du type N et induit la neurodégénérescence (**Ohnishi et al., 2015**). De plus, une réduction de l'activité de la Na^+ / K^+ ATPase a été détectée chez les MA (**Colvin et al., 1991 ;Erecinska et al., 1994; Medina et al., 1995; Hattori et al., 1998; Lomo, 2003**). En conséquence, la consommation d'activateurs de la Na^+ / K^+ ATPase (caféine,ail, oignon, Zinc, Citicoline, rivastigmine, Citicoline, rivastigmine, Vit E, mémantine, thé polyphénol, curcumine et *Alpinia galanga*) améliore les symptômes et ralentit la progression de la MA (**Tsai et al., 2010; Wostyn et al., 2011; Zhang et al., 2013**). L'activité du GLT-1 (transporteur au glutamate) semble aussi être réduite dans la MA (**Lauderback et al., 2001**). La surcharge en glutamate active la Na^+ / K^+ ATPase pour assurer le maintien du gradient transmembranaire, cette activité semble être réduite chez les MA (**Lauderback et al., 2001**).

Une altération des canaux K^+ a également été rapportée chez des MA et il semble que certains canaux K^+ pourraient jouer un rôle majeur dans l'initiation et le développement de la maladie. L'accumulation de l'A β dans les neurones de l'hippocampe inactive le courant potassium voltage dépendant (**Poulopoulou et al., 2010**). L'activation des canaux Kv1.3, Kv1.5 et KCa3.1 a été observé en réponse à la neuroinflammation induite par l'A β . Une expression plus élevée de Kv1.3, limitée aux cellules microgliales a été décrite au niveau du cortex frontal des MA (**Plant et al., 2002**). De plus, les canaux Kv3.1 et Kv3.4 semblent aussi être associés à la MA. L'analyse de l'expression des gènes au niveau du cortex de MA aux différents stades de la maladie montre que Kv3.4 est surexprimé pendant les stades précoces de la maladie ainsi que dans les stades plus avancés. Il convient de noter que la régulation de l'expression du Kv3.4 a été détectée dans le cortex frontal dès les stades I-II de la MA avant l'apparition des plaques amyloïdes et des DNF. Cela indique que le dépôt de l'A β n'est pas un pré-requis pour la surexpression du Kv3.4 (**Angulo et al., 2004**). En outre, l'augmentation de l'expression du Kv3.4 persiste même après la réduction des plaques amyloïdes (**Angulo et al., 2004**). L'expression de la forme mutée de la preséniline I, mutation caractéristique de la forme familiale de la MA, réduit le niveau d'expression du Kv3.1 (**Plant et al., 2002**).

L'expression du Kv3.1 est aussi réduite au niveau du néocortex des souris transgéniques modèle de la MA (souris APPPS1) alors qu'elle est stable pendant le vieillissement (**Boda et al., 2012**). Jusqu'à présent le canal Kv3.1 n'est pas associé aux maladies neurodégénératives. Une baisse du courant Kv2.1 et de l'expression du Kv2.1 des neurones hippocampiques de souris transgéniques 3xTg-AD a également été étudié ; les neurones ont également présenté une diminution globale du nombre de Kv2.1 fonctionnels (**Frazzini et al., 2016**). Une altération du canal Kv4.x semble impliquée dans le développement de la MA. Des mutations du gène PS1 ou PS2 ont été décrites chez des patients atteints de forme familiales de la MA. En effet, l'interaction des protéines PS1 et PS2 avec KChIP3 (protéine accessoire du Kv4.x) aboutit à la formation du complexe PS1- KChIP3- Kv4.x (**Malin et al., 1998; Choi et al., 2001**). Plusieurs études ont également montrés que les BK sont impliqués dans le développement de nombreuses maladies neurodégénératives tels que l'épilepsie et l'ischémie cérébrale. Une hyper activation des BK a aussi été observée pendant les premiers stades de la MA (**Hu et al., 2001; Sanz-Blasco et al., 2008; Hui et al., 2010**).

3.1. Structure et classification

L'étude des canaux K^+ révèle une grande diversité fonctionnelle et structurale. Cette diversité repose sur une grande diversité génique. En effet, dans le génome humain plus de 77 gènes codant pour des sous-unités potassiques ont été identifiés, faisant des canaux K^+ la classe de canaux ioniques la plus diversifiée (**Mazzuca et al., 2007**). Chaque sous-unité possède un ou plusieurs domaines P, qui participent à la formation d'un pore sélectif au K^+ , et un nombre variable de domaines transmembranaires. On distingue trois grandes familles des canaux potassiques définies sur la base de leur homologie structurale (**Figure 29**) (**Lesage et al., 1997**).

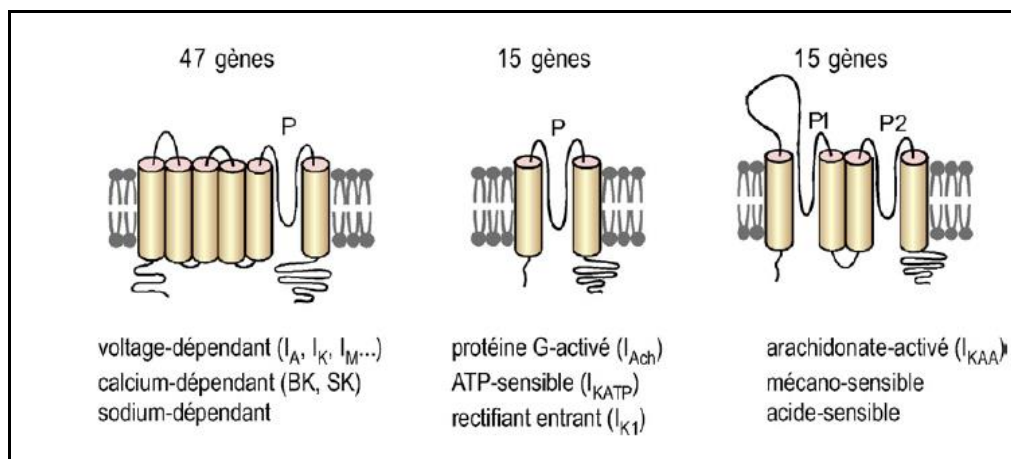


Figure 29 : Différentes classes de canaux K^+

Les différentes sous-unités principales sont réparties en trois grandes classes selon le nombre de segments transmembranaires (STM) et de domaines pore (P) (séquence fortement conservée qui intervient dans la formation du filtre de sélectivité du pore ionique). Les extrémités amino- et carboxyterminales sont intracellulaires. Les canaux K^+ sont des homo- ou des tétramères de sous-unités à six et deux segments transmembranaires, et des dimères de sous-unités à quatre segments transmembranaires (Mazzuca *et al.*, 2007).

Les canaux potassiques sont des protéines intégrées dans les membranes cellulaires avec des structures et des mécanismes de régulation très complexes (Miller *et al.*, 2000).

Les canaux potassiques à six domaines transmembranaires

Comme leur nom l'indique, cette famille regroupe les canaux composés de 6 segments transmembranaires et un domaine P.

Ces canaux sont divisés en deux grandes classes :

- Les canaux dépendant du potentiel (Kv)
- Les canaux sensibles à la concentration intracellulaire de calcium (BK, IK, SK).

Il faut quatre domaines P pour former un canal fonctionnel. En d'autres termes, ces canaux doivent être sous forme tétramérique pour être fonctionnels (**Figure 30**).

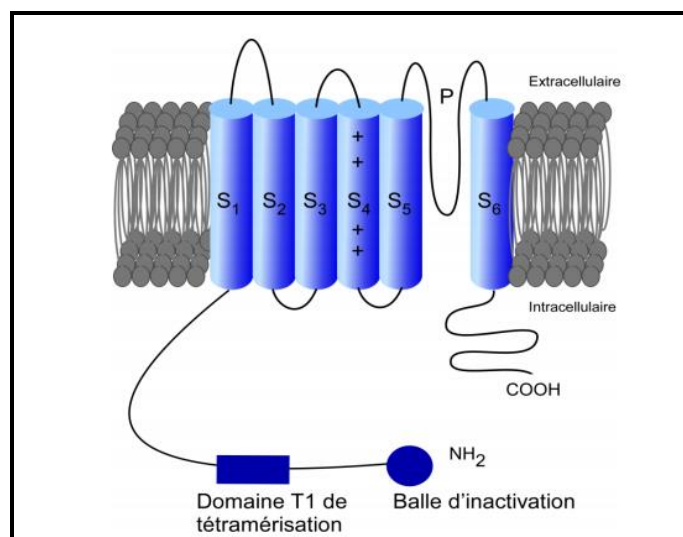


Figure 30 : Topologie membranaire des sous-unités potassiques à 6 segments transmembranaires et 1 boucle P dépendante du potentiel

Quatre boucles P sont nécessaires pour former un pore, ces sous-unités se tétramérisent par l'intermédiaire du domaine T1 situé dans l'extrémité N-terminale. Le segment

transmembranaire S4 est le senseur de voltage apportant la dépendance au potentiel du canal.

Les canaux potassiques à deux domaines transmembranaires

Les canaux potassiques à deux domaines transmembranaires sont composés de 2 segments transmembranaires et d'un domaine P.

Cette famille est formée par les canaux à rectification entrante (Kir), impliqués dans le maintien du potentiel de repos cellulaire à travers des courants de fond. Ils doivent également être sous forme tétramérique pour être fonctionnels.

Les canaux potassiques à quatre segments transmembranaires et deux domaines P

Les canaux potassiques à deux domaines pore (K2P) représentent la famille identifiée récemment. Ce sont des canaux de fond, puisqu'ils sont constitutivement ouverts en conditions physiologiques. Ils sont également très importants dans l'excitabilité cellulaire grâce à leur rôle dans l'établissement et le maintien du potentiel de repos de la cellule (**Honore et al., 2007**). Ces canaux doivent être sous forme dimérique pour être fonctionnels.

Nous nous focaliserons uniquement sur les canaux potassiques voltage dépendant en particulier sur le canal Kv3.1.

3.2. Canaux potassiques voltage-dépendant

Les Kv sont impliqués dans le maintien du potentiel membranaire, dans la détermination de la fréquence et de la durée du potentiel d'action, dans la régulation de la libération des neurotransmetteurs et dans la propagation de l'influx nerveux (**Drewe et al., 1992; Perney et al., 1992; Rettig et al., 1992; Rudy et al., 1992; Goldman-Wohl et al., 1994**). Les Kv s'activent et s'inactivent lentement et sont présents au niveau de la plupart des cellules excitables mais également au niveau des cellules non-excitables comme le lymphocyte T.

Comme leur nom l'indique, l'activité de ces canaux dépend de la valeur du potentiel de membrane. Cette classe forme des canaux dépendant du voltage, des canaux Ca²⁺ sensibles et des canaux cationiques activés par hyperpolarisation. Au niveau structural, ils sont formés de six régions transmembranaires (S1-S6) reliés entre elles par des boucles intra- et extracellulaires. Des études sur la relation structure-fonction ont révélé que le segment transmembranaire S4 est la partie majeure du canal sensible au voltage, contenant des résidus avec des charges positives (lysine ou arginine) exigeant, pour l'activation du canal, des interactions électrostatiques avec les charges négatives des segments S2 et S3 (**Figure 30**)

(**Dolly et al., 1996**). Les parties N et C-terminales sont localisées du côté cytoplasmique. La boucle extracellulaire entre les segments S5 et S6, est impliquée dans la formation du pore (**Giudicessi et al., 2012**). Ces canaux se constituent en tétramères pour être fonctionnels.

3.2.1. Mécanismes d'activation et d'inactivation

D'après les données obtenues grâce aux images de cristallographie, la dépolarisation entraîne une torsion-translation du segment S4 qui permet l'activation du canal (**Doyle et al., 1998**). La torsion-translation du segment impliquant trois charges positives, et l'apparition de deux résidus arginine chargés à la face externe (**Yang et al., 1996**). Son changement de conformation serait alors transmis au segment S6, favorisant l'ouverture du pore (**Bezanilla et al., 2002**). Les mécanismes d'activation semblent être les mêmes pour tous les canaux ioniques de structure similaire (potentiel dépendant). Ils sont simplement contrôlés différemment (**Doyle et al., 1998**).

Les mécanismes responsables de l'inactivation des Kv ont été identifiés, ils sont de deux types.

- L'inactivation de type N fait intervenir l'extrémité N-terminale du canal, d'où son nom (**Hoshi et al., 1991**). Des expériences de délétions ont montré qu'une séquence d'une vingtaine d'acides aminés constitue le segment responsable de l'inactivation. Celui-ci forme une structure compacte, stabilisée par un pont disulfure, qui va obstruer le pore depuis la face cytosolique. Suite à l'activation du canal, cette extrémité vient se fixer sur la boucle cytoplasmique S4-S5, conduisant à l'obstruction du pore et empêchant ainsi le passage des ions. Certaines sous-unités auxiliaires, peuvent mimer la balle d'inactivation et donc provoquer l'inactivation rapide des canaux auxquels elle est associée (**Isacoff et al., 1991**).
- Le deuxième mécanisme d'inactivation implique une région située dans la partie extracellulaire du segment S6. La concentration externe en K^+ a un rôle prépondérant dans l'efficacité de cette inactivation puisque si elle augmente, la vitesse de l'inactivation est réduite. Les Kv sont aussi cibles de plusieurs toxines naturelles et à des molécules pharmacologiques (**Wulff et al., 2009**).

3.2.2. Intérêt d'utilisation de la 4-Aminopyridine

Fampridine est la dénomination commune internationale de la 4-aminopyridine, souvent désignée par 4-AP, substance connue depuis plus de 100 ans. La 4-AP est une base faible, de formule brute C₅H₆N₂ et schématisée en Figure 31.

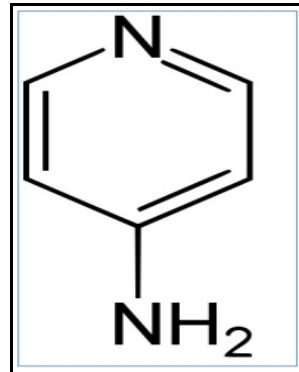


Figure 31: Représentation de la 4-aminopyridine (Waszkielewicz *et al.*, 2013)

La 4-AP peut exister sous une forme neutre ou protonée au pH physiologique (Mologo *et al.*, 1985). Elle bloque les canaux potassiques supprimant ainsi l'efflux de K⁺ (Mologo *et al.*, 1985). Il a été montré que la 4-AP traverse la BHE (Lemeignan *et al.*, 1984). La 4-AP traverse également la membrane plasmique sous sa forme neutre pour ensuite agir à l'intérieur de la cellule sous la forme protonée (Hirsh *et al.*, 1993). La 4-AP est un bloqueur des K_v. Elle prolonge la durée du potentiel d'action axonal et augmente la libération d'acétylcholine au niveau des synapses. L'ouvrage intitulé « Aminopyridines and similarly acting drugs, effects on nerves, muscles and synapses » de Lechat, Thesleff, Bowman (1982) est un document de base sur la pharmacologie des aminopyridines. La 4-AP a un vaste champ d'applications, elle est utilisée comme agent thérapeutique dans le traitement de plusieurs troubles neurologiques, notamment pour atténuer la faiblesse musculaire. Les effets bénéfiques de ce composé réduisent les symptômes des formes légères de la sclérose en plaques (Polman *et al.*, 1994; Schwid *et al.*, 1997; Göbel *et al.*, 2013), de la myasthénie sévère (Li *et al.*, 1994), de l'ataxie de type II (Strupp *et al.*, 2008), de la maladie de Parkinson (Haghdoost *et al.*, 2011) et de la MA (Andreani *et al.*, 2000). La 4-AP atténue aussi les symptômes de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Beeton *et al.*, 2000) et de la maladie du modèle canin (Pinter *et al.*, 1997). De plus, la 4-AP a été associée à une amélioration et un recouvrement partiel des fonctions motrices et sensorielles chez les patients atteints de blessures de la moelle épinière (Segal *et al.*, 2007). Goodman *et al.*, (2008) ont publié les résultats d'un essai clinique (phase III) de la 4-AP à une dose de 10 mg /2 fois par

jour contre un placebo chez des malades présentant une sclérose en plaques avec des troubles de la marche. La 4-AP a amélioré la capacité de marche d'un certain nombre de malades (**Goodman et al., 2008**). Un effet significatif sur tous les autres paramètres évalués était également observé dans ce groupe de patients dits « répondeurs ». Ces effets se maintenaient durant toute la période du traitement et étaient observés indépendamment de l'âge des patients, de leur degré de handicap ou de la forme de la maladie (rémittente-récurrente ou progressive) (**Goodman et al., 2008**).

Sur la base de ces résultats, la molécule a reçu l'approbation des Agences du Médicament Américaine et Européenne en 2010 et 2011 respectivement, pour le traitement des difficultés à la marche dans la sclérose en plaques. Les données de tolérance confirment la sécurité de cette molécule, quand elle est utilisée avec les précautions recommandées. Des études en cours, cliniques et électrophysiologiques, devraient permettre de mieux en comprendre le mécanismes d'action.

3.2.3. La sous famille des Kv3 : focus sur Kv3.1

Structure et localisation de Kv3.1

La sous-famille Kv3 se caractérise, en particulier, par un seuil d'activation très élevé et par une fréquence d'activation et de désactivation rapide ce qui assure une courte durée du potentiel d'action et une courte période réfractaire. Ce courant est responsable de la génération des potentiel d'action de haute fréquence (**Rudy et McBain, 2001; Wang et al., 2007**). Leur suppression réduit la fréquence des potentiels d'action (**Rudy et McBain, 2001**). Les canaux Kv3 mammifères et humains sont des tétramères composés par l'assemblage de sous-unités codées par les gènes *KCNC* (Kv3.1, *KCNC1* ; Kv3.2, *KCNC2* ; Kv3.3, *KCNC3* et Kv3.4, *KCNC4*) qui s'assemblent en homomères ou en hétéromères pour former un Kv tétramérique. Kv3.1 et Kv3.2 codent pour le courant K^+ à rectification retardée, Kv3.3 et Kv3.4 codent pour le courant K^+ de type A (**Gutman et al., 2005; Rudy et al., 1999**). Les différents isoformes peuvent s'associer et forment des canaux hétéromériques. En particulier, Kv3.1 et Kv3.2 co-immunoprécipitent in vivo (**Hernández-Pineda et al., 1999**).

Kv3 sont abondamment exprimés dans le SNC. Ils sont assemblés au niveau des interneurons, des cellules de Purkinje, et des noyaux auditifs centraux (**Gan et al., 1998; Raman et al., 1999**). La distribution des quatre isoformes de Kv3 est différente (**Weiser et al., 1994; Chang et al., 2009**). Chez les humains, l'expression du Kv3.1 est restreinte au SNC (**Drewe et al., 1992**). Chez la souris, Kv3.1 est exprimé en plus dans le muscle squelettique et

dans les lymphocytes T (**Luneau et al., 1991; Grissmer et al., 1992**).

Selon la nomenclature standard (**Chandy et al., 1991**), NGK2 est maintenant nommé Kv3.1a, tandis que Kv4 est renommé Kv3.1b (**Yokoyama et al., 1989, Luneau et al., 1991**). Ces deux isoformes résultent d'épissage alternatif du gène KCNC1 (**Luneau et al., 1991**); les 18 derniers acides aminés du côté C-terminal de la forme Kv3.1a sont substitués par 84 acides aminés pour la forme Kv3.1b (**Luneau et al., 1991**). Le canal Kv3.1 a également été appelé Raw2 (**Rettig et al., 1992**) et KShIIIB (**Vega-Saenze de Miera et al., 1992**).

Le profil d'expression de Kv3.1 a été étudié (**Perney et al., 1992; Parameshwaran-Iyer et al., 2003; Feng et Morest, 2006; Bortone et al., 2006**). Kv3.1, la sous-unité la plus abondante, est exprimé dans les cellules granuleuses du cervelet, dans le noyau réticulaire du thalamus, dans le cortex cérébral et l'hippocampe, et à des intensités inférieures au niveau du colliculus inférieur et du complexe de l'olive supérieure (**Perney et al., 1997; Boda et al., 2012**). Kv3.1 est exprimé au niveau du soma, des dendrites, des axones, des noeuds de Ranvier et des terminaisons pré-synaptiques (**Weiser et al., 1995; Rudy et al., 1999; Ozaita et al., 2002; Devaux et al., 2003; Trimmer et Rhodes, 2004**).

Kv3.1 et maladie d'Alzheimer

Une possible implication des canaux Kv3.1 et Kv3.4 dans le développement de la MA a été proposée. En effet, l'exposition des neurones et des cellules gliales à l'A β induit une modulation du niveau d'expression des Kv3.1 et Kv3.4 dès les stades précoces de la MA (**Angulo et al., 2004; Franciosi et al., 2006**). **Boda et al.** ont suggéré qu'une modification de l'expression du Kv3.1 pourrait induire un changement de la répartition des autres Kv3 et du courant Kv3 ce qui contribuerait au développement de la MA (**Boda et al., 2012**). Kv3.3 est souvent colocalisé avec Kv3.1. Le plus important c'est que la délétion de l'une ou de l'autre de ces sous-unités provoque la double élimination des deux (**Ho et al., 1997; Espinosa et al., 2001; McMahon et al., 2004**). Par exemple, les mutations de KCNC3 ont été signalées comme cause de l'ataxie spino-cérébelleuse humaine SCA13; des altérations fonctionnelles sont également présentes lorsque l'expression du Kv3.3 chevauche avec celle de Kv3.1 (**Waters et al., 2006; Figueroa et al., 2011; Middlebrooks et al., 2013**). De plus, les mutations KCNC1 ont été aussi identifiées comme cause de l'épilepsie myoclonique et de l'ataxie (**Fábio et al., 2016**). En plus des bloqueurs universels du Kv3.1, principalement la triéthylammonium (TEA) et la 4-AP (**Ganet et al., 1998**), de nouveaux modulateurs du canal Kv3.1 ont été développés tels que (AUT000206) de la société Autifony, utilisé pour le

traitement de la perte d'audition liée à l'âge et de la schizophrénie associée à une hyperexpression du Kv3.1 au niveau du neocortex (**Yanagi et al., 2014; Gavin et al., 2016**). Ces modulateurs ont permis de restaurer l'expression de la parvalbumine par les interneurons GABAergiques, et de réduire les déficits cognitifs et comportementaux (**Leger et al., 2014; Gavin et al., 2016**). La modulation pharmaceutique (AUT1 et AUT2) des courants Kv3.1 représente aussi un potentiel thérapeutique dans le traitement des troubles de l'audition (**Marcelo et al., 2015; Maile et al., 2016**).

III. Modèles animaux de la MA

1. Choix d'un modèle animal de la MA

Le choix d'un modèle animal pour l'étude de la MA reste un problème difficile. Comme de nombreux modèles animaux pathologiques, les modèles animaux de la MA ne développent qu'une partie des aspects de la pathologie. Il faut donc choisir le modèle le mieux adapté à la cible que l'on veut étudier. Plusieurs paramètres doivent être pris en compte: similitudes avec les aspects moléculaires de la pathologie, similitudes avec l'évolution symptomatique de la pathologie, disponibilité des animaux, facilité d'élevage et coûts. Les modèles animaux développant spontanément une pathologie proche de la MA sont très certainement les modèles les mieux adaptés pour rendre compte des évolutions anatomiques, moléculaires et symptomatiques de la MA au cours du temps. Cependant leur utilisation reste encore très limitée du fait de la difficulté d'accès aux animaux, du temps de développement de la pathologie qui est en général relativement long, du faible nombre d'animaux développant réellement la pathologie et des difficultés liés à l'élevage de ces animaux. De plus, peu d'espèces animales développent spontanément une pathologie proche de la MA. La présence de lésions cérébrales de type amyloïde et/ou neurofibrillaire a été mise en évidence chez de nombreuses espèces d'animaux âgés: chien, chat, chèvre, mouton, ours, carcajou et chez plusieurs primates comme le singe ou le microceb âgés (**Van Dam et al., 2010**). L'utilisation de modèles expérimentaux lésionnels ou transgéniques permet de limiter les inconvénients relatifs aux modèles animaux décrits précédemment. L'induction lésionnelle dans le cerveau de rats ou de souris permet de reproduire une partie des aspects de la pathologie de manière ponctuelle mais reste limitée pour l'étude du développement de la pathologie in vivo. L'injection de peptide A β sous différentes formes est par exemple un moyen rapide d'obtenir des agrégats de peptides A β dans le tissu cérébral, mais ce procédé est très éloigné de l'apparition temporelle et progressive des lésions qui a lieu chez l'Homme. La plupart des études de la MA sur modèles animaux ont aujourd'hui recours à la technologie de la

transgénèse avec la souris comme espèce de prédilection.

2. Les souris transgéniques comme modèles de la MA

Les souris transgéniques peuvent être distinguées en trois groupes suivant le nombre de transgènes qu'elles possèdent: les souris simple, double et triple transgéniques (**McGowan *et al.*, 2006; Duyckaerts *et al.*, 2008**).

2.1. Les souris simple-transgéniques

Les souris simple-transgéniques possèdent un gène supplémentaire leur permettant de développer une ou plusieurs caractéristiques données de la pathologie. Il s'agit pour la plupart de ces modèles de reproduire les aspects moléculaires des lésions β -amyloïdes et des DNF. L'insertion du gène APP muté humain seul permet la production de peptide β -amyloïde et la formation d'agrégats amyloïdes dans le tissu cérébral (**Games *et al.*, 1995**). L'insertion du gène de l'une ou l'autre des présénilines (PS1 ou PS2) ne permet pas la production de peptides β - amyloïdes. Parmi les principaux modèles de souris simple-transgéniques pour l'étude des lésions amyloïdes, on peut citer les souris PDAPP (**Games *et al.*, 1995**) ou tg2576 (**Hsiao *et al.*, 1996**). Les mutations du gène codant la protéine Tau induisent le développement de démences frontotemporales chez l'Homme (**Poorkaj *et al.*, 1998**). Seuls quelques modèles de souris simple transgéniques pour le gène Tau ont été produites et développent des lésions similaires aux DNF observées chez l'Homme (**McGowan *et al.*, 2006**). Il est à noter qu'il existe une souche de souris, les souris rTg4510, développées afin d'étudier les effets de la suppression de l'expression du transgène Tau sur l'évolution de la pathologie (**SantaCruz *et al.*, 2005**). Ces souris possèdent un transgène composé d'un élément de réponse à la tétracycline situé en amont d'ADNc codant la protéine Tau humaine mutée. Ces souris développent des lésions de type DNF au cours du vieillissement et présentent des déficits cognitifs et une perte neuronale. L'ajout de tétracycline dans la nourriture des animaux inhibe l'expression du transgène ce qui induit un arrêt de la perte neuronal et un rétablissement des déficits cognitifs. Le nombre de DNF continue d'augmenter même en supprimant l'activité du transgène ce qui suggère que les DNF ne seraient pas responsables de la toxicité de la protéine Tau.

2.2. Les souris double-transgéniques

Les souris double-transgéniques se caractérisent par l'expression de deux gènes mutés humains. Il s'agit en général des gènes de l'APP humaine et de la β ou γ -sécrétase. La cotransfection de la PS1 mutée humaine (γ -sécrétase) avec l'APP mutée humaine permet

d'augmenter le nombre de lésions et de les faire apparaître plus rapidement (**Borchelt et al., 1997**). Ces souris présentent de nombreux points de similitude avec la MA: la production de peptide β -amyloïde et son agrégation dans le tissu cérébral, l'altération des fonctions synaptiques, le développement de troubles du comportement (**Duyckaerts, 2009**). Les principaux points négatifs concernant ces modèles expérimentaux sont l'absence de pathologie neurofibrillaire, la différence de topographie des lésions amyloïdes entre la souris et l'Homme, la forte présence de peptide intracellulaire controversée chez l'Homme.

2.3. Les souris triple-transgéniques

Plusieurs solutions ont été envisagées afin de réunir les aspects de la MA liés à la protéine Tau et aux peptides amyloïdes: le croisement de souris mutantes pour la protéine Tau humaine avec des souris double-transgéniques APP/PS1, l'injection de peptides $A\beta$ dans le cerveau de souris mutantes pour la protéine Tau humaine ou encore l'insertion directe des

Revue bibliographique – Modèles animaux de la MA 72 gènes APP, PS1 et Tau humains mutés. Cette dernière solution est celle qui semble donner les meilleurs résultats quant à la présence de plaques amyloïdes et de DNF.

2.3.1. Les souris 3xTgAD

En 2003, Oddo et al. ont décrit le premier modèle murin présentant les deux lésions typiques de la MA réunies: les souris 3xTgAD (**Oddo et al., 2003**). Ce modèle animal de la MA est celui que nous avons privilégié au cours de notre étude. L'établissement de cette nouvelle lignée de souris a été réalisé en introduisant directement deux transgènes dans la lignée germinale d'une souris génétiquement modifiée. Les transgènes codant l'APP mutée humaine (APP^{swe}) et la protéine Tau mutée humaine (TauP301L) ont été micro-injectés dans des embryons unicellulaires provenant de souris homozygotes pour le gène codant pour PS1 mutée humaine (PS1M146V). Ces souris ont préalablement subi un knock-in du gène PS1M146V. Chez les souris ainsi produites, les deux transgènes sont insérés dans le même locus. Le croisement des souris hétérozygotes de la lignée F1 permet d'obtenir des animaux homozygotes pour les trois gènes. Chez ces animaux, les gènes APP et Tau sont exprimés sélectivement dans le système nerveux central (SNC), mais de façon hétérogène. Le cortex, l'hippocampe et le thalamus présentent notamment de forts taux de ces deux protéines. Au contraire les quantités d'APP et de protéines Tau sont très faibles, voire inexistantes dans le cervelet, l'hypothalamus et les bulbes olfactifs. Il a été montré que l'APP était bien clivé pour produire des peptides β -amyloïdes. La quantité d' $A\beta$ dans le cerveau des souris 3xTgAD augmente en fonction de l'âge. Cette croissance est plus rapide et intense pour les espèces $A\beta_{42}$ que $A\beta_{40}$. La présence de peptide $A\beta$ en intraneuronal est la première manifestation neuropathologique observée

chez ces souris. L'immunoréactivité de l'A β à l'intérieur des neurones est mise en évidence à partir de 3 à 4 mois dans le néocortex et à partir de 6 mois dans le champ CA1 de l'hippocampe. Les premiers dépôts d'A β extracellulaires deviennent visibles à partir de l'âge de 6 mois dans le cortex frontal. A partir de 12 mois, la présence de dépôts amyloïdes est mise en évidence dans différentes régions corticales et dans l'hippocampe. Les premières manifestations neuropathologiques de la protéine Tau dans l'espace intraneuronal sont observées à partir de l'âge de 12 mois. L'immunoréactivité de la protéine Tau est dans un premier temps mise en évidence dans les neurones pyramidaux du champ CA1 de l'hippocampe. La progression des lésions Tau vers les structures corticales se fait plus tardivement. La progression des lésions dans le tissu cérébral est similaire à celle observée chez l'Homme (**Oddo et al., 2003**). Les PA apparaissent dans le néocortex puis atteignent la région CA1 de l'hippocampe. Les DNF apparaissent dans un premier temps dans la région hippocampique puis se développent vers les aires corticales. Les souris 3xTgAD présentent également une dysfonction synaptique dans la région CA1 de l'hippocampe à partir de l'âge de 6 mois. A cet âge, les mesures effectuées en électrophysiologie sur tranches d'hippocampe montrent que la transmission synaptique basale et la potentialisation à long terme sont affectées (**Oddo et al., 2003**). Ces deux mécanismes sont notamment impliqués dans les processus de mémoire. La dysfonction synaptique serait directement liée à la présence d'espèces intracellulaires d'A β . A cet âge et dans l'hippocampe, les souris 3xTgAD ne présentent en effet que des formes intracellulaires d'A β . De plus, des souris 2xTgAD PS1M146V /Taup301L présentant des lésions Tau-positives mais pas de lésions liées à l'A β , ne développent pas de dysfonction synaptique mesurable en électrophysiologie (**Oddo et al., 2003**). Ces résultats sont étayés par des tests cognitifs montrant un déficit au niveau de la mémoire à long terme à partir de l'âge de 4 mois, âge auquel on observe la présence d'A β dans l'espace intraneuronal chez ces souris. Les descriptions anatomo-pathologiques des cerveaux de souris 3xTgAD supportent l'hypothèse de la cascade amyloïde dans la MA. En accord avec cette hypothèse, les lésions β - amyloïdes sont les premières lésions observées chez la souris 3xTgAD et pourraient initier une cascade physiopathologique similaire à celle observée dans la MA. Les lésions liées à la protéine Tau sont observées plus tardivement et seraient le résultat de l'action du peptide A β . Toujours en accord avec la cascade amyloïde, le peptide amyloïde serait à la base de la dysfonction synaptique observée chez ces souris. Cependant, il ne serait pas le seul acteur de la dégradation des performances cognitives chez ces souris. En effet, la diminution de la quantité d'A β soluble et de protéine Tau permet d'améliorer les performances cognitives alors qu'une

diminution de la quantité d'A β soluble seule ne permet pas d'obtenir de tels résultats (**Oddo et al., 2006**). En conclusion, les lésions cérébrales retrouvées chez les souris 3xTgAD présentent de nombreux points d'homologie avec celles rencontrées chez l'Homme. Les souris 3xTgAD développent les deux types de lésions caractéristiques de la MA: les plaques amyloïdes et les DNF. La densité et la progression topographique de ces lésions sont dépendantes de l'âge des animaux. La topographie des lésions est proche de celle rencontrée chez l'homme. Les souris 3xTgAD développent une dysfonction synaptique dans les régions concernées par les processus mnésiques. Plusieurs points relatifs à la MA n'ont pas encore été retrouvés chez ces souris. Il n'existe par exemple pas de données de la littérature concernant l'atrophie cérébrale. Malgré tout, les nombreuses similitudes avec la pathologie humaine retrouvées chez ces animaux indiquent clairement que les souris 3xTgAD sont un bon modèle de la MA.

En conclusion, de nombreux modèles animaux de la MA existent. Les modèles obtenus par transgénèse présentent des avantages importants pour l'expérimentation par rapport aux modèles mimant la forme sporadique de la pathologie. Parmi ces modèles transgéniques, la souris triple-transgénique 3xTgAD est sans doute le modèle le plus complet sur le plan histopathologique. Les souris 3xTgAD ont notamment l'avantage de développer les deux types de lésions cérébrales caractéristiques de la MA: les plaques amyloïdes et les DNF.

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les maladies neurodégénératives sont des pathologies évolutives à l'étiologie complexe qui se traduisent par une symptomatologie lourde pour laquelle aucun diagnostic *ante mortem* est disponible. Par ailleurs, les traitements disponibles actuellement sont des thérapeutiques symptomatiques et non curatives. Aucun traitement satisfaisant n'est encore disponible. De nombreuses recherches centrées sur les acteurs clé de la pathogenèse sont menées et plusieurs molécules sont actuellement en cours de développement. Cependant, ces dernières n'ont pas été retenues, du fait notamment d'effets secondaires importants. Ainsi, cibler d'autres acteurs des maladies neurodégénératives pourrait constituer une nouvelle piste intéressante dans l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. C'est dans cette nouvelle perspective que notre recherche s'est portée sur l'étude des altérations de l'environnement lipidique évoluant vers la neurodégénérescence et la perte synaptique en prenant plus particulièrement en compte l'impact de différents lipides bioactifs sur l'homéostasie potassique.

Compte tenu de l'augmentation de dérivés oxydés du cholestérol, principalement 7KC et 24S-OHC, de l'accumulation d'AGTLC ($C \geq 22$) et de la dérégulation de l'homéostasie potassique cérébrale dans la physiopathologie de la MA, nous avons cherché à préciser les relations qui pourrait exister entre les altérations cellulaires engendrées par ces dérivés lipidiques (7KC, 24S-OHC et C24:0) et l'homéostasie potassique en s'intéressant aux Kv et plus particulièrement à Kv3.1.

Nous avons fait le choix de focaliser notre étude sur des oligodendrocytes et des cellules microgliales. En effet, les oligodendrocytes sont considérés comme des cellules hautement vulnérables, leur nombre est réduit de 27 % dans le cerveau des personnes âgées. Il est admis que la démyélinisation observée chez les patients MA au stade précoce pourrait être une étape initiatrice de la maladie. Quant aux cellules microgliales, bien que leurs implications dans la neurodégénérescence soient encore controversées, leurs dysfonctionnements pourraient contribuer au stress oxydant et à l'inflammation qui constituent des éléments caractéristiques de différentes maladies neurodégénératives.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Etude *in vitro*

1. Modèles cellulaires : Oligodendrocytes 158N et cellules microgliales BV-2

1.1. Caractéristiques des cellules 158N et BV-2

La lignée cellulaire oligodendrocytaire 158N est une lignée murine immortalisée par l'antigène T du virus SV40 à partir de culture primaires mixtes de cerveaux de souris mâles sauvages Tabby (Ta/Y). Leurs caractéristiques ultrastructurales, antigéniques et fonctionnelles ont été déterminées par l'équipe du Dr. Saïd M. Ghandour à l'Université de Strasbourg (**Feutz *et al.*, 2001; Ghandhour *et al.*, 2002**). Les cellules 158N ont été caractérisées plus en détail dans notre laboratoire (**Baarine *et al.*, 2009**). Cette lignée cellulaire constitue un modèle intéressant pour aborder les dysfonctionnement moléculaires associés aux AGTLC et aux oxystérols afin de mieux comprendre la physiopathologie de la MA, de la sclérose en plaques et de l'X-ALD. Ces cellules expriment fortement les marqueurs PLP, MBP, MOG et CNPase (protéines caractéristiques d'oligodendrocytes matures), les transporteurs peroxysomaux Abcd1 et Abcd3 ainsi que Acox1 et L-PBE des enzymes impliquées dans la β -oxydation peroxysomale des AGTLC.

Les cellules BV-2 sont des cellules microgliales de souris immortalisées par une transfection stable de l'oncogène v-raf/v-mycau moyen du rétrovirus J2 (**Stansley *et al.*, 2012**). Ces cellules sont fréquemment utilisées dans les études des fonctions des microglies et peuvent être utilisées comme une alternative de cultures primaires du fait qu'elles conservent la plupart des propriétés morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles trouvées dans les cellules microgliales fraîchement isolées (**Blasi *et al.*, 1990; Henn *et al.*, 2009**). La lignée BV-2 a servi de modèle d'étude à l'élimination des plaques séniles artificielles, à la phagocytose, au stress oxydatif et à l'inflammation. Elle a aussi été utilisée par notre équipe pour illustrer les dysfonctions mitochondriales et peroxysomales induites par certains dérivés oxydés du cholestérol tel que le 7-cétocholestérol qui favorise une baisse de l'expression des transporteurs Abcd1, Abcd2, Abcd3, Acox1 et Mfp2 (**Nury *et al.*, 2017**).

1.2. Culture et traitements des 158N et BV-2

Les cellules 158N sont cultivées dans du milieu de culture DMEM (Lonza, Bale, Suisse) supplémenté par 5 % de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min (Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Allemagne) et 1 % de pénicilline/streptomycine (100 U/mL de pénicilline, 100 U/mL de streptomycine) (Pan Biotech GmbH). Le milieu de culture des cellules BV-2 est composé de RPMI 1640 (Lonza)

additionné de 10 % de SVF décomplémenté (Pan Biotech GmbH) et 1 % de pénicilline/streptomycine (Pan Biotech GmbH).

Les 158N et les BV-2 sont cultivées en boîtes de Pétri (100x20 mm style, BD Biosciences) (10 mL de milieu de culture) à une densité de 2×10^6 cellules dans un incubateur à atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ à 37°C et entretenues deux fois par semaine. A confluence, le milieu de culture des 158N est éliminé, le tapis cellulaire est rincé avec du DPBS (Phosphate Buffered Saline) (Lonza), sans calcium et sans magnésium ce qui permet de supprimer toute trace d'inhibiteurs de trypsine, puis les cellules sont détachées sous l'action conjuguée de trypsine (0,5 mg/mL) et d'EDTA (0,2 mg/mL) (Pan Biotech) à 37°C. Après 2-3min, le détachement des cellules est contrôlé au microscope. Une fois détachées, l'action de la trypsine est arrêtée par l'ajout de milieu de culture. Les BV-2 sont collectées par pipettages successifs lorsqu'elles sont à environ 70% de confluence. Les cellules sont récupérées par centrifugation (200 g pendant 5 min). Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est homogénéisé dans du milieu complet frais, puis les cellules sont comptées sur cellules de Malassez. La suspension cellulaire obtenue sert à réensemencer de nouvelles boîtes de Petri et à préparer des plaques de culture pour réaliser les différents traitements à étudier. Les 158N sontensemencées à une densité de 120×10^3 cellules par puits en plaques 12 puits et à 10×10^3 cellules par puits en plaques 96 puits. Les BV-2 à une densité de 60×10^3 cellules dans un volume de 1 mL en plaque 12 puits et à 5×10^3 cellules dans 200 µL de milieu de culture par puits de plaque 96 puits.

Après 24 h de culture, les cellules sont cultivées pendant 1, 3, 8, 14, 24 ou 48 h en absence ou en présence des différentes concentrations de 7KC (2,5, 12,5 et 25 µM), de 24S-OHC (2,5, 12,5 et 25 µM) ou de C24:0 (1, 5, 10 et 20 µM) et associées ou non à la 4-AP (2,4 mM) (Sigma-Aldrich). Lors des co-traitements, la 4-AP (2 mM) est ajoutée dans le milieu de culture 1 h avant le 7KC, le 24S-OHC ou le C24:0.

Le 7KC et le 24S-OHC sont préparés à la concentration de 2 mM (800 µg/mL). Pour cela, 0,8 mg d'oxystérols (7KC, ou 24S-OHC) sont dissous dans 50 µL d'éthanol absolu. Après dissolution, 950 µL du milieu de culture complet sont ajoutés. Ces solutions sont utilisées de façon à obtenir des concentrations finales de chaque oxystérol qui n'excède pas 25µM (10 µg/mL). Dans ces conditions, la concentration finale d'éthanol ne dépasse pas 0,05 %, ce qui n'affecte pas les caractéristiques de croissance cellulaire (**Lizard *et al.*, 1999**).

Le C24:0 (Sigma-Aldrich), peu soluble en milieux aqueux, est solubilisé dans l' α -cyclodextrine (Sigma-Aldrich) (20 mM) afin d'obtenir une concentration de 400 μ M dans des pilluliers en verre stérilisés, puis soniqué jusqu'à obtention d'une solution homogène. L' α -cyclodextrine possède une cavité carbonée apolaire et hydrophobe capable d'accueillir des molécules peu hydrosolubles, tandis que l'extérieur de la molécule possède de nombreux groupements hydroxyles, conduisant à une bonne solubilité en milieux aqueux. L' α -cyclodextrine va donc jouer le rôle d'une « cage » soluble en milieu aqueux qui va entourer les AGTLC insolubles pour les solubiliser.

La solution d' α -cyclodextrine (20 mM) est préparée dans du tampon tris-HCl (100 mM, pH=8) et filtrée sur filtre Millipore de diamètre 0,2 μ m afin d'obtenir une solution stérile.

La 4-AP est préparée dans du milieu de culture complet de façon à obtenir une solution de concentration 400 mM.

2. Analyse de la morphologie cellulaire

La morphologie des cellules (taille, contour du cytoplasme, adhésion et regroupement ou non des cellules en amas, détachement, etc) est étudiée en plaques 12 puits après 1, 3, 8, 14, 24 et 48 h de traitement par le 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), le 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 μ M) et le C24:0 (1 ; 5 ; 10 et 20 μ M) associés ou non au 4-AP (2 mM) à l'aide d'un microscope à contraste de phase (Axiovert 40CFL, Zeiss) équipé d'une caméra AxioCam.

2.1. Analyse de la morphologie nucléaire par microscopie à fluorescence après coloration au Hoechst 33342

L'analyse de la morphologie des noyaux est faite par coloration de l'ADN par le Hoechst 33342 (λ_{Exmax} = 350 nm, λ_{Emmax} 461 nm) fluorochrome spécifique des paires de bases (A-T) (Sandhu *et al.*, 1985) qui est capable de franchir la membrane cytoplasmique. Les cellules apoptotiques sont caractérisées par des noyaux condensés et /ou fragmentés et éventuellement par la présence des corps apoptotiques (Lizard *et al.*, 1995).

Après 24 h de traitement avec le 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), le 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 μ M) et le C24:0 (1 ; 5 ; 10 et 20 μ M) associés ou non au 4-AP (2 mM) en plaque 12 puits, les cellules adhérentes et non adhérentes sont récupérées et centrifugées 5 min à 300 g. Le culot cellulaire obtenu est fixé avec du PFA 2% pendant 10 min à température ambiante. Après lavage, les cellules sont reprises dans 1 mL de PBS à 2 μ g/mL de Hoechst 33342 pendant 5 min. Une solution stock de Hoechst 33342 est préparée à 0.5 mg/mL et conservée à +4°C. Les

cellules sont ensuite lavées 2 fois et environ 40 000 cellules et déposées sur une lame de microscope et cytocentrifugées à 1200 tours/min pendant 5 min (cytopspin 2, Shandon/Thermo Scientific) puis montées entre lame et lamelle en présence de « mounting fluorescent medium » (Dako). Les lames peuvent être stockées à + 4°C. La morphologie nucléaire est observée avec un microscope à fluorescence (Axioskop fluorescent, Zeiss) sous Ultra-violet (UV) et le pourcentage de noyaux apoptotiques est déterminé par comptage de 300 noyaux par lame.

3. Étude de la viabilité cellulaire

3.1. Dénombrement cellulaire par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse des cellules en suspension dans un flux de liquide ; les cellules sont véhiculées à grande vitesse jusqu'à une chambre d'analyse traversée par un ou des faisceaux lasers. La cytométrie en flux consiste en l'analyse des signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau laser. Ce procédé d'analyse, cellule par cellule, est quantitatif et les signaux mesurés sont essentiellement relatifs aux propriétés intrinsèques et extrinsèques des éléments analysés (diffractions et fluorescences). Pour le comptage, ils correspondent aux phénomènes de diffusions lumineuses liées aux dimensions de la particule (diffusion aux petits angles ou forward scatter, FSC) et à sa structure interne ou granulométrie (diffusion aux grands angles ou side scatter, SSC).

Les cellules adhérentes et non adhérentes cultivées en plaques 12 ou 96 puits pendant 1, 3, 8, 14 et 24 h en présence ou en absence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 µM), de 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 µM) et de C24:0 (1 ; 5 ; 10 et 20 µM), associés ou non au 4-AP (2 mM) sont récupérées. Le nombre des cellules est déterminé par comptage en cytométrie en flux (Galaxy, Partec).

3.2. Numération cellulaire en présence de bleu trypan

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

Après 24 ou 48 h de traitement avec du 7KC (2,5; 12,5 et 25 µM), du 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 µM) et du C24:0 (1 ; 5 ; 10 et 20 µM), les cellules adhérentes et non adhérentes ont été

récupérées et le culot a été resuspendu dans 1 mL de milieu de culture. La coloration au bleu trypan a été réalisée en prélevant 25 μL de suspension cellulaire mis en présence de 25 μL de solution de bleu trypan.

3.3. Analyse du potentiel transmembranaire mitochondrial par le 3,3'-dihexyloxcarbocyanine iodide (DiOC₆(3))

Le gradient des protons provoqué par la chaîne respiratoire mitochondriale et la distribution asymétrique des protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale crée un gradient chimique (ΔpH) et un gradient électrochimique ($\Delta\Psi\text{m}$) élevé entre l'espace intermembranaire et la matrice. Cette différence de potentiel est essentielle pour maintenir la fonction physiologique de la chaîne respiratoire (production d'ATP) et le contrôle de la perméabilité membranaire mitochondriale (**Huttemann et al., 2008**). La mesure de $\Delta\Psi\text{m}$ est largement utilisée pour caractériser l'activité métabolique mitochondriale et la mort cellulaire à un stade précoce (**Chen, 1988**). La baisse de $\Delta\Psi\text{m}$ peut être appréhendée par la perte de la capacité des mitochondries à accumuler des sondes cationiques lipophiles comme l'iodure de 3,3'-dihexyloxcarbocyanine (DiOC₆(3)) ($\lambda_{\text{Ex max}} = 484 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em max}} = 501 \text{ nm}$) utilisé en cytométrie en flux (**Schlattner et al., 2001**). Le DiOC₆(3) s'accumule dans la matrice mitochondriale en fonction de la différence de potentiel : cette sonde s'accumule d'autant plus dans les mitochondries que celles-ci maintiennent un gradient de protons important (cellules vivantes).

Pour évaluer l'effet des différents composés testés à différentes concentrations sur le potentiel membranaire mitochondriale, les cellules adhérentes et non adhérentes traitées pendant 24 ou 48 h par le 7KC (2,5 ; 12,5 et 25 μM), le 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 μM) et le C24:0 (1 ; 5 ; 10 et 20 μM), en plaques 12 puits sont récupérées, lavées puis reprises dans une solution de DiOC₆(3) (Molecular Probes, Life Technologies) à 40 nM dans 1 mL de PBS pendant 15 min à 37°C. La solution mère de DiOC₆(3) est préparée dans du diméthylsulfoxyde DMSO à une concentration de 1 mM. Cette solution est par la suite diluée dans de l'eau distillée à une concentration de 20 mM et conservée à -20°C. Après incubation, la fluorescence associée au DiOC₆(3) est analysée sur un cytomètre en flux Galaxy (Partec) après excitation à 488 nm récupérée à travers un filtre de bande passante $524 \pm 44\text{nm}$. 10 000 événements sont analysés par échantillon. Les cellules formants des agrégats (doublets et autres) ne sont pas prises en compte dans l'analyse. Le pourcentage de cellules avec des mitochondries dépolarisées correspond au pourcentage de cellules DiOC₆(3) négatives ; il est quantifiée sur une échelle logarithmique de fluorescence en utilisant les logiciels Flomax (Partec) ou Flowjo (Tree Star

Inc.).

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

L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) intracellulaire peut être détecté par coloration à la dihydroéthidine (DHE). La DHE est un composé non fluorescent pouvant diffuser à travers la membrane cytoplasmique et qui, sous l'action de $O_2^{\bullet-}$, s'oxyde rapidement en éthidium fluorescent ($\lambda_{Ex\ max} = 488\ nm$; $\lambda_{Em\ max} = 575\ nm$). L'éthidium va ensuite se fixer de façon covalente au niveau des bases de l'ADN (Rothe *et al.*, 1990). Ceci permet sa rétention dans la cellule et donc sa détection par cytométrie en flux.

Les cellules cultivées en absence ou en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), de 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 μM) et de C24:0 (1 ; 5 ; 10 et 20 μM) ont été trypsinées et mises en suspension dans 1 mL de PBS. La solution mère de DHE a été préparée dans du DMSO à une concentration de 1,6 mM. Cette solution est par la suite utilisée sur les cellules à la concentration finale de 2 μM . Après 15 min d'incubation à 37°C, l'analyse est réalisée par cytométrie en flux sur un cytomètre en flux Galaxy (Partec). La fluorescence de l'éthidium produit collectée par un filtre de bande passante $590 \pm 20\ nm$ est mesurée sur une échelle logarithmique de fluorescence en prenant en compte 10 000 cellules. Les données ont été analysées avec le logiciel Flomax (Partec) ou Flowjo (Tree Star Inc.).

3.5. Evaluation de l'intégrité de la membrane cytoplasmique par coloration à l'iodure de propidium (IP)

La viabilité cellulaire peut être quantifiée par évaluation de l'intégrité de la membrane cytoplasmique déterminée par coloration à l'IP (Ormerod *et al.*, 1993). L'IP ne colore que les cellules avec des membranes cytoplasmiques altérées (Lizard *et al.*, 1995) en s'intercalant entre les acides nucléiques (ADN et ARN) (Yeh *et al.*, 1981). C'est un fluorochrome hydrophile de type phénanthrène qui s'excite à 305 et à 538 nm et qui émet une fluorescence orange/rouge avec un maximum d'émission à 617 nm.

Après 24 ou 48 h de traitement en absence ou en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), de 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 μM) et de C24:0 (1 ; 5 ; 10 et 20 μM) en plaques 12 puits, les cellules adhérentes et non adhérentes sont récupérées, centrifugées 5 min à 300 g et reprises dans 1 mL de PBS à 1 $\mu g/mL$ d'IP (Sigma-Aldrich) préparé à partir d'une solution stock à 1 mg/mL dans de l'eau distillée et stockée à 4°C à l'abri de la lumière. Les cellules sont incubées 15 min à 37°C avec la sonde. 10 000 cellules sont analysées par cytométrie en flux sur un Galaxy (Partec). La fluorescence orange / rouge de l'IP est sélectionnée par un filtre de

bande passante 590 ± 20 nm. Cette fluorescence est quantifiée sur une échelle logarithmique et les données sont ensuite analysées à l'aide des logiciels Flomax (Partec) et Flowjo (Tree Star Inc.). Le pourcentage des cellules ayant perdu l'intégrité de leur membrane cytoplasmique (cellules mortes) correspond au pourcentage de cellules IP positives.

3.6. Étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux :détection des cellules en Sub-G1

La technique d'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux est souvent utilisée pour évaluer l'induction d'apoptose via la présence d'un pic Sub-G1 (**de Lima-Bessa et al., 2008**). La fragmentation du matériel génétique en fragment multiple de 100-200 paires de bases (fragmentation internucléosomale) est une des étapes ultimes de cette mort programmée. La fraction de cellules avec un ADN fragmenté correspond par conséquent aux cellules ayant un contenu en ADN inférieur à celui des cellules en G0/G1. Cette hypodiploïdie (inférieur à $2n$) est représentée par un pic qui précède celui de la phase G0/G1 appelé Sub-G1.

Les fluorochromes utilisés par cytométrie en flux doivent être capables de s'intercaler de façon stoechiométrique entre les bases azotées de la double hélice d'ADN et d'émettre une bonne fluorescence après liaison à l'ADN. Ils sont regroupés en deux catégories principales :

- Les agents intercalants: IP, bromure d'éthidium (**Ormerod, 1992**),
- Les fluorochromes spécifiques aux paires de bases: Hoechst 33342/33258 (2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazole) (A-T) (**Dubey, 1983**) et mithramycine (G-C) (**Phillips et al., 2006**).

La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est analysée par cytométrie en flux en utilisant l'IP. L'ARN double brin, capable d'interférer avec le marquage de l'ADN est éliminé par les RNases. Les cellules traitées pendant 24 h en boîtes de Pétri (50 x 15 mm) sont récupérées, centrifugées 5 min à 300 g, rincées une fois au PBS puis fixées dans 1 mL d'éthanol à 80% glacial froid (-20°C) pendant 12 h, créant des micropores dans la membrane cytoplasmique. Les cellules fixées sont ensuite réhydratées par deux lavages et incubées dans 100 μL d'une solution tampon de PBS contenant 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase A (Sigma-Aldrich) et 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'IP pendant 1 h à 37°C . Les micropores permettent la pénétration de l'IP qui pourra aller s'intercaler dans l'ADN. Au cours des lavages successifs des cellules, les micropores laissent échapper dans le milieu extracellulaire de petits fragments d'ADN résultant de l'apoptose. Les cellules apoptotiques se retrouvent alors avec un contenu

en ADN fortement diminué, néanmoins marquées par l'IP, générant ainsi le pic sub-G1. Le volume de chaque tube est ajusté à 1 mL et 10 000 cellules sont analysées à l'aide du cytomètre en flux Galaxy (Partec) en utilisant le filtre de bande passante 590 ± 20 nm pour détecter la fluorescence de l'IP. L'acquisition et l'analyse des données sont faites avec le logiciel Flomax en mode linéaire.

4. Mesure de la fluidité membranaire par cytométrie en flux après coloration à la Merocyanine 540 (MC 540)

La fluidité membranaire (ou microviscosité membranaire) est contrôlée par l'efflux de cholestérol et l'ordre d'arrangement lipidique au niveau membranaire. Elle peut être mesurée par un fluorochrome hydrophobique la Merocyanine 540 (MC 540) (**Rathi et al., 2001**) (**Figure 32**). La MC 540 ($\lambda_{Ex_{max}}=555$ nm; $\lambda_{Em_{max}} = 578$ nm) agit en détectant une diminution de l'ordre d'assemblage des phospholipides dans le feuillet externe de la bicouche lipidique de la membrane plasmique (**Langner, 1993**). L'intensité de fluorescence émise dépend du degré de désordre lipidique présent dans la membrane plasmique : si les phospholipides membranaires sont bien organisés, l'accumulation de MC 540 dans la membrane cytoplasmique est faible ; à l'inverse, si ils sont désorganisés l'accumulation de MC 540 est forte (**Harrison, 2005**).

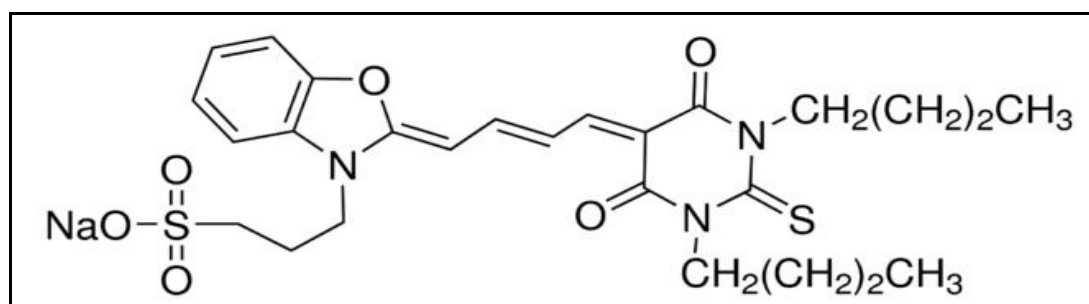


Figure 32: Structure de la Merocyanine 540 (MC 540)

Les cellulesensemencées en plaques 12 puits et traitées pendant 1, 3, 8, 14 et 24 h avec les différentes concentrations de 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), de 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 μ M) et de C24:0 (1 ; 5 ; 10 et 20 μ M) sont récupérées, centrifugées 5 min à 300 g et reprises dans 1 mL de PBS contenant 2,5 μ g/mL de MC 540 (Sigma-Aldrich). La solution stock de MC 540 est préparée dans l'éthanol (100%) à 1 mg/mL. Après 10 min d'incubation à 37°C, 10 000 événements de chaque échantillon sont analysés au cytomètre en flux Galaxy (Partec). La fluorescence de la MC 540 est collectée par un filtre de bande passante 590 ± 20 nm en mode logarithmique. Les données sont analysées à l'aide du logiciel Flomax (Partec). Les résultats

sont présentés sous la forme du Rapport = cellules fortement colorées MC 540 / cellules faiblement colorées MC 540.

5. Mesure du potentiel membranaire par spectrophotométrie après coloration par la sonde DiBAC2(3)

Dans toute cellule, il existe une inégalité des ions de part et d'autre de la membrane plasmique. Cette inégalité explique l'existence d'un potentiel membranaire due à une différence de charges de part et d'autre de membrane cellulaire. Ce sont les ions inorganiques (K^+ , Cl^- , Na^+) qui sont les principaux responsables de la régulation électrique de la cellule. Certains stimuli peuvent entraîner un mouvement des ions de part et d'autre de la membrane et par conséquent une dépolarisation ou une hyperpolarisation membranaire.

Les variations de potentiel membranaire sont étudiées par la sonde fluorescente bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid) triméthine oxonol (DiBAC2(3)) sensible aux variations du potentiel membranaire (**Figure 33**). DiBAC2(3) ($\lambda_{Ex\ max}= 544\ nm$; $\lambda_{Em\ max}= 584\ nm$) est une sonde chargée négativement. Elle est capable d'entrer dans les cellules dépolarisées et de se lier aux protéines membranaires intracellulaires. L'augmentation de la quantité d'oxonol dans la cellule provoque une augmentation de la fluorescence émise. A l'inverse, l'hyperpolarisation, provoque une diminution de la quantité d'oxonol dans la cellule et donc une diminution de la fluorescence.

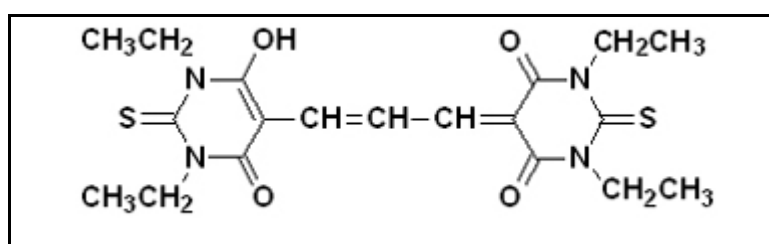


Figure 33 : Structure de la sonde DiSBAC2(3)

La solution stock du DiBAC2(3) (Interchim, France) est préparée dans le DMSO à la concentration de 5 mM et conservée à $-20^{\circ}C$. Pour chaque condition expérimentale, les cellules cultivées pendant 24 h en absence ou en présence de 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2.5 ; 12.5 et 25 μM) et C24:0 (1 ; 5 ; 10 et 20 μM) dans des plaques noires en polystyrène de 96 puits sont lavées avec la solution (20 mM HEPES, 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, and 5 mM glucose [pH 7.4]) à 5 μM DiBAC2(3). Les cellules sont incubées par la suite pendant 30 min en présence de DiBAC2(3) à une concentration finale de 10 μM DiBAC2(3) à $37^{\circ}C$. L'intensité de la fluorescence relative au

DiBAC2(3) est mesurée par fluorimétrie (Infinite M200 Pro, Tecan). La fluorescence est rapportée au nombre de cellules par condition du traitement.

6. Mesure de la concentration intracellulaire du potassium

6.1. Mesure par la sonde PBFI-AM

La modification de la teneur intracellulaire en K^+ a été étudiée par un indicateur fluorescent, le PBFI-AM ($\lambda_{Ex\ max} = 340$ et 380 nm ; $\lambda_{Em\ max} = 500$ nm) (ester acétoxyméthyle du potassiumbindingbenzofuran isophthalate). Le PBFI est formé de deux fluorophores benzofuranes isophthalates liés à l'azote d'une diaza-éther-couronne. La taille de la cavité confère la sélectivité pour le K^+ (**Figure 34**).

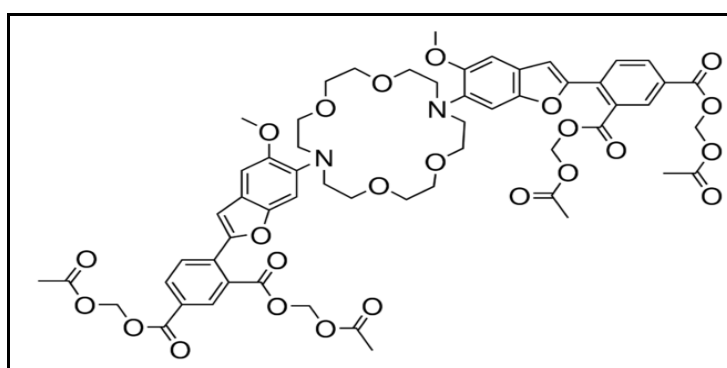


Figure 34 : Structure de la sonde PBFI-AM

Le PBFI-AM est lipophile, son groupement neutre AcétoxyMéthylester (AM) lui permet de franchir facilement la double couche lipidique. Une fois à l'intérieur des cellules, les estérases aspécifiques présentes dé-estérifient la sonde qui est alors piégée dans la cellule. Ainsi, la proportion de sonde sous forme liée et libre est fonction de la concentration intracellulaire de K^+ ($[K^+]_i$). La sonde PBFI est une sonde ratiométrique à double excitation / simple émission. La sonde s'excite dans l'ultraviolet à deux longueurs d'onde différentes. Elle s'excite à 340 nm lorsqu'elle est sous forme liée (PBFI - K^+) et à 380 nm sous forme libre (PBFI) et émet à 500 nm.

L'enregistrement de la fluorescence émise issus de la double excitation à 340 nm et 380 nm, permet d'obtenir un ratio: $R = (\text{fluorescence émise à } 340 \text{ nm} / \text{fluorescence émise à } 380 \text{ nm})$ relatif à la $[K^+]_i$.

Les cellules cultivées, dans des plaques noires en polystyrène 96 puits, en présence ou en absence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 μM) et C24:0 (1 ; 5 ; 10 et 20 μM). Après 24 h, les cellules sont lavées par la solution HBSS (137 mM NaCl, 5 mM

KCl, 1,2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM D-glucose, 10 mM HPSS [pH=7,4]) puis incubées avec 10 µM PBFI-AM (Sigma-Aldrich) en présence de 0.04% Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich). L'acide pluronique F-127 est ajouté afin d'obtenir un meilleur rendement du chargement des cellules en PBFI-AM vu que ce dernier est peu soluble en solution aqueuse. Après 2 h d'incubation à 37°C à l'obscurité, les cellules sont lavées 2 fois avec du HBSS. Les mesures de la fluorescence émise à 500 nm ($n \geq 12$), après calibration, sont effectuées dans 200 µL de HBSS, à l'aide d'un fluorimètre (Infinite M200 Pro, Tecan). Les enregistrements sont réalisés en conservant les mêmes paramètres (gain, intensité, nombre et position de mesure) pour les deux longueurs d'onde d'excitation (340 et 380 nm).

6.2. Mesure du potassium par photomètre à flamme

La photométrie à flamme a aussi été utilisée pour déterminer le contenu intracellulaire en K⁺ (Diana *et al.*, 1987). Cette technique est basée sur la capacité d'un élément donné d'émettre une radiation caractéristique lorsqu'on lui fournit de l'énergie. Les cations métalliques sont susceptibles d'être excités par une flamme. Des électrons sont amenés à un niveau d'énergie supérieur par chauffage dans la flamme d'un brûleur à gaz, et, lors du retour à l'état fondamental, il y a émission d'énergie lumineuse sous forme de photons qui sera transformée en intensité électrique. L'intensité de l'émission est alors proportionnelle au nombre d'atomes présent dans l'échantillon à analyser. Après 24h de culture, en absence ou en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 µM), 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 µM) et C24:0 (1 ; 5 ; 10 et 20 µM) sont lavées avec la solution HBSS (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM D-glucose, 10 mM HPSS [pH=7,4]) puis suspendu dans 1 mL d'eau déionisée et subissent des cycles successifs de congélation et de décongélation dans l'azote liquide. Ces solutions sont analysées par photométrie à flamme (Biocode Hycel PHF 108, Biocode Hycel, Liège, Belgique).

7. Immunofluorescence indirecte

Les cellules 158N et BV-2 traitées, pendant 24 et/ou 48 h, par le 7KC (2,5; 12,5 et 25 µM), le 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 µM) et le C24:0 (1 ; 5 ; 10 et 20 µM) sont lavées, puis fixées pendant 10 min par du PFA 2%. L'action du PFA est arrêtée par un lavage avec du PBS puis les cellules sont incubées pendant 20 min par la solution de saturation (PBS, 10 % SVF, 0.05 % saponine). Après lavage des cellules en PBS, 100 µL d'anticorps anti-Kv3.1 (polyclonal de lapin (Abcam, Cambridge, UK; ref: ab101693), monoclonal de souris (Santa-Cruz Biotechnology, Santa-Cruz, CA, USA; ref: sc-514554); monoclonal de souris (Sigma-Aldrich; ref: SAB5200030, anti-kv3.1b)), dilué au 1/100 dans la solution de saturation sont

ajoutés sur le culot cellulaire issu de chaque condition de culture. Un témoin non marqué et un autre conjugué (sans anticorps primaire) sont réalisés. Après 1 h d'incubation à + 4°C, les cellules sont lavées avec du PBS et incubées pendant 30 min à température ambiante avec 100 µL d'anticorps secondaire marqué à Alexa Fluor 488 ($\lambda_{Ex\ max}= 495\ nm$; $\lambda_{Em\ max}= 519\ nm$) (Invitrogen/Molecular Probes) dilué au 1/500 dans la solution de saturation. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS et analysées par cytométrie en flux. La fluorescence verte de l'Alexa Fluor 488 est quantifiée par un filtre de bande passante $520 \pm 10\ nm$ sur un cytomètre en flux Galaxy (Partec). 10000 cellules sont analysées pour chaque échantillon sur une échelle logarithmique. L'intensité des signaux révélés est mesurée avec le logiciel Flomax.

Pour l'analyse par microscopie à fluorescence, les cellules sont contre-colorées avec du Hoechst 33342 à 1 µg/mL et montées entre lame et lamelles selon la technique décrite en **2.2**. Les lames sont observées sous microscope à fluorescence (Axioskop, Zeiss). Les images sont prises à l'aide d'une caméra AxioCam (Zeiss).

8. Quantification de l'expression protéique par Western blot

8.1. Extraction et dosage des protéines

Les extraits cellulaires sont préparés après 24 h de traitements par du 7KC (2,5; 12,5 et 25 µM), 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 µM) et C24:0 (1 ; 5 ; 10 et 20 µM) associés ou non au 4-AP (2 mM) dans des boîtes de Pétri (100x20 mm). Les cellules adhérentes et non adhérentes sont collectées par grattage, centrifugées à 300 g pendant 5 min puis lavées avec du PBS. Le culot cellulaire est suspendu dans 100 µL de tampon de lyse RIPA (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet NP40 1%, sodium déoxycholate 0,5%, SDS 0,1 %, EDTA 2 mM et NaF 50 mM, pH 8) en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics Corporation) pendant 30 min dans la glace. Les lysats sont ensuite centrifugés 15 min à 14 000 g à 4°C pour éliminer les débris cellulaires non lysés. Les surnageants contenant les protéines sont récupérés dans de nouveaux tubes qui peuvent être stockés à -20°C jusqu'au moment de dosage.

La quantité de protéines est relative au nombre de cellule pour chaque condition de culture. Le dosage des protéines a été réalisé par le kit BCA (Sigma-Aldrich) constitué d'acide bicinchoninique et d'ions cuivriques en milieu alcalin. Les ions cuivreux générés par réduction des liaisons peptidiques forment avec le BCA un complexe stable et intensément coloré. Le dosage est réalisé en microplaque 96 puits. 2,5 µL de l'extrait protéique sont dilués dans 22,5 µL d'eau distillée et incubés en présence de 175 µL du mélange BCA et d'ions

cuvieux (50:1) pendant 30 min à 37°C puis l'intensité de la coloration est mesurée à 570 nm par un spectrophotomètre (MRX Revelation, Dynex). Les échantillons sont dosés en triplicat et la concentration protéique des échantillons a été calculée à partir d'une gamme d'étalonnage d'albumine sérique bovine (BSA) de 0 à 25 µg.

8.2. Électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines totales extraites et dosées sont séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Ce type d'électrophorèse permet de séparer les protéines chargées négativement par le SDS en fonction de leur poids moléculaire sous l'effet d'un champ électrique. 50 à 80 µg de chaque extrait sont mélangés avec du tampon de charge 4X (pour 20 mL de tampon 4X : 8 mL de glycérol, 4 mL de β-mercaptoéthanol, 2 g de SDS, 5 mL de Tris 1 M pH 6,8, quelques cristaux de bleu de bromophénol qsp 20 mL) puis séparées sur gel de polyacrylamide avec le système « Protein Electrophoresis Classroom Lab Set 2 » (Biorad). Ce dernier est un copolymère d'acrylamide et bis-acrylamide constitué d'un gel de concentration de 4 % et d'un gel de séparation dont la concentration en acrylamide/bisacrylamide dépend des masses des protéines à séparer (**Tableau 4**).

Tableau 4. Composition des différents types de gel d'acrylamide

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

Celui-ci est placé dans un tampon de migration (Tris base 25 mM, SDS 0,1%, glycine 190 mM, pH entre 8,3 et 8,8) sous un ampérage de 20 mA (60 V) pour le gel de concentration et à 40 mA (120 V) pour le gel de séparation. Après électrophorèse, le gel servira au transfert des protéines.

8.3. Transfert des protéines

Le transfert est réalisé sur une membrane de nitrocellulose (Nitrocell mbrane-0,45 µM, Fisher scientific) avec le système de transfert Mini Trans-Blot Cell (Biorad). Le gel d'acrylamide est pris en sandwich avec la membrane de nitrocellulose, deux papiers Wattman 3 mm et deux scotch brit imprégnées du tampon de transfert (Tris base 50 mM, acide borique 50 mM) et est soumise à un courant de 50V pendant 30 min pour les protéines de poids moléculaire inférieur 50 KDa et pendant 1 h pour celles entre 50 et 100 KDa sous agitation, avec refroidissement.

8.4. Immunorévélation des protéines

Une fois le transfert terminé, la membrane est saturée par une solution tampon riche en protéines (PBS-T 0,1% (PBS, 0,1% Tween20) contenant 5% de lait écrémé ou de la BSA), de manière à éviter toute adhésion non spécifique des anticorps de révélation au niveau des sites de liaisons non occupés par les protéines transférées. Après 1 h d'incubation à température ambiante et sous agitation, la membrane est incubée avec l'un des anticorps primaires d'intérêt (**Tableau 5**) préparé dans du tampon de saturation, sous agitation toute la nuit à 4°C puis en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) pendant 1 h à température ambiante. Des séries de 3 lavages de 5 min avec la solution de TBST 0,1% sont effectuées après chaque étape. Le complexe « antigène-anticorps primaire-anticorps secondaire » formé est détecté à l'aide du kit de chimioluminescence (Supersignal West Femto Maximum Sensitivity (Fisher Scientific)). Le signal est enregistré avec l'appareil ChemiDoc XRS+ (BioRad) et l'analyse de densitométrie des bandes obtenues est effectuée par le logiciel Image Lab (BioRad).

Tableau 5. Conditions d'utilisation des anticorps primaires et secondaires

Anticorps	Références commerciales	dilution	Solution	Caractéristiques
<i>Anticorps primaires</i>				
Caspase-3	Cell signaling	1/1000	PBST 5% lait	Polyclonal de Lapin
Kv3.1	Sigma-Aldrich	1/500	PBST 1% BSA	Monoclonal de souris
PARP	Cell signaling	1/1000	PBST 1% lait	Polyclonal de lapin
β -actine	Sigma-Aldrich	1/10 000	PBST 1% lait	Polyclonal de souris
<i>Anticorps secondaire</i>				
HRP	Santa Cruz	1/5000	PBST 1% lait	Chèvre anti lapin et anti souris

9. Techniques d'électrophysiologie

9.1. Le xénope *Xenopus laevis*

Le xénope *Xenopus laevis* connu sous le nom de grenouille à griffe d'Afrique du Sud est un amphibien de l'ordre des anoures et membre de la famille des Pipidés (**Figure 36**). C'est un animal aérobie mais totalement aquatique ne remontant à la surface de l'eau que pour respirer.

Ces batraciens ont normalement une face dorsale de couleur foncée et tachetée et une peau riche en chromatophores qui peuvent changer en fonction des conditions environnementales. Leur taille est relativement importante, les mâles sont 30 % plus petits que les femelles (**Goldin, 1992**).



Figure 35 : Le xénope *Xenopus laevis*

Les xénopes femelles sont élevées dans l'animalerie de l'Institut Pasteur –Tunis. Le xénope se satisfait d'un simple aquarium ou d'un bac dans lequel il vit en pleine eau. La contenance minimum d'un bac pour maintenir une quinzaine de femelles doit être de l'ordre de 50 litres. Chaque bac doit être recouvert d'un couvercle grillagé pour empêcher la fuite des animaux. L'eau d'élevage doit être dépourvue de chlore et la température maintenue à 22°C. Le nettoyage des bacs est réalisé de façon régulière.

L'alternance nyctémérale de l'éclairage sera assurée par une horloge avec une périodicité de 12 h/12 h. Les xénopes sont nourris deux fois par semaine avec du cœur et /ou du foie de bœuf ou de poulet, ils sont supplémentés de granulés vue leur régime qui est exclusivement en viande et pauvre en calcium et en vitamine D (**Gurdon *et al.*, 1971**).

9.2. Les ovocytes de xénope

Les ovocytes de xénope sont prélevés à partir des lobes ovariens. Chez la femelle xénope, les ovaires représentent 15% du poids total de la grenouille pendant la reproduction et sont chacun constitués de 24 lobes (**Lofts, 1974**). Chaque lobe contient des centaines d'ovocytes à tous les stades de développement (**Figure 36**).

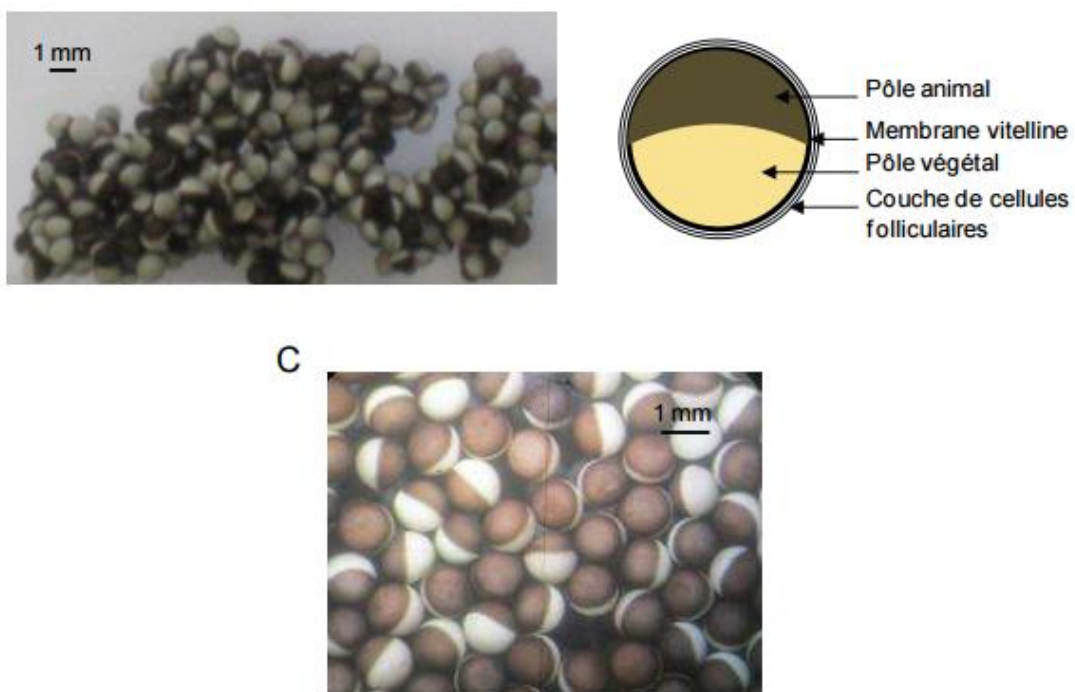


Figure 36 : Les ovocytes de xénope. A. Ovocytes de xénope avant traitement à la collagénase. B. Représentation d'un ovocyte de xénope de stade V avant traitement à la collagénase (modifié d'après Bianchi, 2006). C. Ovocytes de xénope après traitement à la collagénase.

Un ovocyte est entouré de plusieurs couches de cellules :

- Membrane vitelline : couche non cellulaire fibreuse qui donne sa rigidité à l'ovocyte
- Cellules folliculaires : couche de cellules qui ont de nombreuses connections avec l'ovocyte *via* des jonctions de type Gap (**Browne et al., 1979**), possèdent des canaux potassium endogènes et doivent donc être éliminées par un traitement à la collagénase.

Le développement des ovocytes se fait en six stades. En évoluant, ceux-ci changent de couleur et augmentent de taille. Dans la majorité des cas, le stade V est optimal pour les enregistrements électrophysiologiques. En effet, à ce stade, les ovocytes sont de grande taille et peuvent être facilement et délicatement pénétrés par les électrodes. Ils ont une taille de 1 à 1,2 mm avec les hémisphères animal et végétatif bien distincts. Le stade VI est caractérisé par l'apparition d'un croissant équatorial non pigmenté.

Les ovocytes de xénope ont été exploités dans la recherche en laboratoire et ce système devint vite très populaire pour l'expression hétérologue et la caractérisation fonctionnelle des canaux ioniques, de récepteurs et de transporteurs clonés (**Dascal, 1987 ; Sigel, 1990**). Les ovocytes de xénope comportent plusieurs avantages par rapport aux lignées cellulaires pour l'expression hétérologue :

- Les xénopes sont facile à entretenir, n'exigent pas trop de place, ne coûtent pas très cher et permettent l'obtention de plusieurs centaines d'ovocytes par opération,
- Le diamètre des ovocytes est d'environ 1 mm, ce qui facilite leur manipulation et l'injection de substances,
- Les conductances endogènes sont relativement faibles en amplitude,
- Les ovocytes sont capables de traduire l'ARN ou l'ADN injecté mais également dans certains cas d'effectuer des modifications post-traductionnelles nécessaires au fonctionnement de la protéine (**Sigel, 1990**),
- La manipulation des ovocytes est faite à température ambiante, en milieu non stérile, et ils peuvent être maintenus près de 12 jours dans un milieu adéquat.

9.3. Prélèvement des ovocytes de xénope

La xénope est anesthésiée dans un bain—de solution de 2 L de Tricaine (Ethyl 3-Aminobenzoate Methanesulfonate, Sigma) à 1,7g/ L pendant 45 min à. Une incision de 0,5 à 1 cm est réalisée en laparotomie (au niveau du flanc du xénope) et les sacs d'ovocytes sont prélevés délicatement à l'aide de pinces. L'incision doit être recousue avec du fil résorbable stérile (Vicryl, 3.0) en réalisant des points serrés permettant de maintenir la plaie hermétiquement fermée. La xénope est ensuite placée sous l'eau pour enlever la tricaine. Il est inutile d'appliquer des antibiotiques sur la plaie car la peau du xénope secrète des peptides ayant des activités antimicrobiennes à large spectre (**Soravia et al., 1988**). Les sacs ovariens prélevés sont lavés et séparés en paquets d'une centaine d'ovocytes dans une Solution de Barth modifiée avec calcium (MBS + Ca²⁺) constitué de 88 mM de NaCl, 1 mM de KCl, 0,41 mM de MgCl₂, 2,4 mM de CaCl₂, 2,4 nM de NaHCO₃, 0,33 mM de Ca (NO₃)², 0,82 mM de MgSO₄ et de 10 mM d'Hepes (pH= 7,5 ajusté avec du NaOH 5N). Les ovocytes sont ensuite lavés avec une solution de Barth modifiée sans calcium (MBS-Ca²⁺) constituée de 88 mM de NaCl, 1 mM de KCl, 0,41 mM de MgCl₂, 2,4 nM de NaHCO₃, 0,82 mM de MgSO₄ et de 10 mM d'Hepes (pH= 7,5 ajusté avec du NaOH 5N). Une défolliculation enzymatique des ovocytes en agitation douce pendant 45 à 50 min (collagénase A et B (1 mg/mL) permet d'enlever la couche de cellules folliculaires qui entourent les ovocytes. Cette étape est cruciale, car les cellules folliculaires constituent une barrière mécanique gênant les nano-injections de matériels génétique et l'empalement des microélectrodes d'enregistrement. De plus, elles ralentissent le retour à un potentiel de membrane stable après la dépolarisation induite par l'empalement (**Kusano et al., 1982**). Par la suite, les ovocytes sont lavés trois fois par la solution MBS. Pour dénuder les ovocytes, une défolliculation manuelle est aussi nécessaire, elle se fait sous loupe binoculaire et à l'aide de deux pinces fines.

Les meilleurs ovocytes seront alors transférés dans des solutions d'incubation de type MBS+Ca²⁺ et ils seront incubés pendant quelques heures à 19° - 20°C, puis ils seront transférés dans une solution MBS-Ca²⁺ avant d'entamer les enregistrements.

9.4. Transcription in vitro des ADN clonés

Avant leur expression dans les ovocytes de xénope, les différents ADN clonés ont été transcrits en ARN à l'aide du kit T7 mMESSAGE mMACHINE® (Ambion®, Austin, Texas, USA). Les plasmides servant de matrice à la réaction de transcription ont été précédemment linéarisés avec une endonucléase : SpeI (Promega) pour les sous-unités auxiliaires clonées dans le vecteur pGEM et NotI (Invitrogen) pour les sous-unités principales clonées dans pGH19 (**Tan et al., 2002**). La réaction de transcription a été faite à 37°C suivant les

instructions du fournisseur. Les ARN ont ensuite été purifiés avec le kit MEGAclear™ (Ambion®) puis conservés à -80°C.

9.5. Injection des ovocytes

Les injections d'ARN dans l'ovocyte ont été réalisées grâce à un nano-injecteur automatique Nanoject II (Drummond Scientific Company, Broomall, Pennsylvanie, USA). Elles se font grâce à des capillaires (Drummond) étirés avec une étireuse (Narashige, Japon). Pour l'expression des canaux Kv3.1, l'injection d'un mélange de sous-unité principale et de sous-unité auxiliaire dans un rapport 1:1, a été faite dans le cytoplasme de l'ovocyte. Le volume injecté variait de 8,2 nL à 50,6 nL d'ARN pour une concentration allant de 0,2 à 0,5 µg/µL. Les quantités injectées étaient donc de l'ordre de 2 à 35 ng d'ARN. Après injection, les ovocytes ont été incubés à 4°C pendant 15 min, puis ils ont été placés dans du milieu d'incubation (SOS normal supplémenté de gentamycine 50 mM, pénicilline/streptomycine 100 mM et pyruvate de sodium 2,5 mM (Sigma-Aldrich)). L'incubation moyenne pour les différentes combinaisons de sous-unités principales et sous-unités auxiliaires était de 2-3 jours à 18°C.

9.6. Mesure du courant Kv3.1 par la technique de la double microélectrode en potentiel imposé

La technique de la double micro-électrode intracellulaire est utilisée pour mesurer les flux ioniques traversant les canaux ioniques exprimés dans les ovocytes de xénopes. Nous avons utilisé cette technique afin de caractériser les effets du 7KC (25 µM), 24S-OHC (25 µM) et C24:0 (20 µM) sur les courants Kv3.1 .

Le stand de mesures électrophysiologiques est protégé par une cage Faraday, pour éviter le maximum de bruits de fond externes. Sous loupe binoculaire, l'ovocyte est placé dans une encoche au fond d'une cuve en plexiglas immergée dans une solution qui diffère selon le type d'enregistrement est qui est appliquée en perfusion grâce à un distributeur de solution à électrovalves (Biologic).

L'ovocyte est empalé par deux micropipettes préparées à l'aide d'une étireuse programmable (Sutter Instruments), une électrode d'enregistrement est connectée à l'entrée de l'amplificateur (Geneclamp500B – Axon Instruments) et l'autre électrode d'injection du courant est connectée à la sortie de l'amplificateur différentiel. La résistance externe des micropipettes est mesurée avant tout enregistrement et leurs résistances doivent respecter l'intervalle 1-2 MΩ (**Figure 35**).

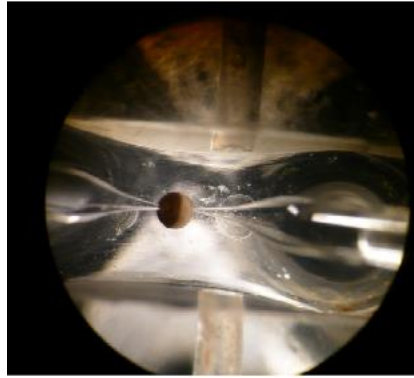


Figure 37: Un ovocyte de *Xenopus laevis* empalé par deux microélectrodes

La microélectrode est une micropipette remplie d'une solution KCl à 3 M très conductrice, dans laquelle est plongé un fil d'argent chloruré. Cette microélectrode est connectée à l'amplificateur (Geneclamp 500 B, Axon Instruments) qui est à son tour relié à un oscilloscope analogique / numérique (Hameg) qui permet de visualiser les réponses électriques de la cellule. Pour stocker et analyser ces activités électriques, un logiciel pClamp8 (Axon Instrument) gère tout le stand *via* une interface (Digitata 1440A, Axon Instruments) reliée à une carte d'acquisition installée dans l'unité centrale de l'ordinateur (**Figure 37**).

Pour la mesure du courant Kv3.1, la conductance de cellules entières (G) a été calculée selon l'équation suivante:

$$G = I_{max} / (V - E_K)$$

où I représente le courant stationnaire mesuré à la fin de chaque étape de dépolarisation, V le potentiel et E_K le potentiel d'inversion du potassium calculé à -98 mV.

Les valeurs de conductivité ont été exprimées en fonction du potentiel de la membrane et étaient adaptées à une seule *distribution de Boltzmann* de la forme suivante:

$$y = \max / [1 + \exp (V1 / 2 - V) / k]$$

où V représente le potentiel d'essai, $V1 / 2$ le potentiel de demi-activation, et k le facteur de pente (**Wickenden et al., 2008**).

II. Etude *in vivo*

1. Description du modèle murin

L'ensemble des expérimentations effectuées dans la partie *in vivo* de ce travail a été menée sur des souris J20. Ce modèle de souris transgénique a été développé par **Mucke *et al.* (2000)**. Ces souris expriment la forme mutée du précurseur d'A β humaine (APP) portant les mutations (Swedish 670/671 KM->NL) au niveau du site de clivage de la β -sécrétase et la mutation Indiana (717 V->F hAPP) au niveau du site de clivage de la γ -sécrétase. Ces mutations sont liées à la forme familiale de la MA. L'expression du transgène PDGF-hAPPS_{we/Ind} est entraînée par le promoteur PDGF- β (**Lopez-Toledano *et al.*, 2007**). Ces souris produisent plus d'A β que celles transfectées par l'APP non mutée. Le taux d'A β dans les neurones hippocampiques et le néocortex augmentent entre 6 et 36 semaines d'âge. A l'âge de 28 semaines, 50% des souris J20 développent des plaques amyloïdes dans le gyrus denté et le néocortex et près de 100% des souris à l'âge de 32 semaines ont des plaques amyloïdes dans tout le cerveau (**Mucke *et al.*, 2000 ; Dudal *et al.*, 2004**). En 2016, **Hong *et al.*** ont détecté des dépôts d'A β au niveau de l'hippocampe des souris J20 dès 4 semaines (**Hong *et al.*, 2016**). De plus, cette lignée développe des pertes neuronales progressives variables selon les régions cérébrales. Des pertes importantes sont observées au niveau de la région hippocampique CA1 à partir 12 semaines (**Wright *et al.*, 2013**). Elle présentent aussi une microglie importante dès 24 semaines (**Wright *et al.*, 2013**).

C'est le premier modèle de souris transgénique qui présente des troubles de mémoire de référence dès l'âge de 4 à 8 semaines (**Harris *et al.*, 2010**). Les troubles de mémoire spatial sont observés après 12 semaines (**Lustbader *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2007; Meilandt *et al.*, 2008**). Des changements dans la plasticité synaptique sont également observés entre 12 et 24 semaines ce qui engendre des déficits dans la transmission synaptique basale (**Saganich *et al.*, 2006**).

Ces caractéristiques justifient l'utilisation des souris J20 à l'âge de 36 semaines dans le but d'établir une cartographie spécifique des zones de dépôt des biomarqueurs conventionnels de la maladie d'Alzheimer (A β), de marqueurs peroxysomiaux (expression des transporteurs peroxysomiaux Abcd3), et de l'expression de Kv3.1b au niveau cérébral. Par ailleurs, une analyse de profil lipidique plasmatique et érythrocytaire a été faite chez les souris J20 et leurs contrôles.

Les souris transgéniques et sauvages de même fond génétique ont été remises par nos

collaborateurs de l'équipe de Neuroprotection endogène dans les maladies neurodégénératives (Dr Catherine Desrumaux, laboratoire « Mécanismes Moléculaires dans les Démences Neurodégénératives », Université de Montpellier, INSERM, École Pratique des Hautes Études).

2. Etude de comportement des souris : Labyrinthe en Y (Y maze)

Le test expérimental mis en place dans le cadre de l'étude in vivo des troubles comportementaux, induits chez les souris transgéniques J20, est le celui de la labyrinthe en Y destiné à apprécier la mémoire de travail et la mémoire de référence de court terme (**Kokkinidis *et al.*, 1976**).

Le labyrinthe en Y est composé de trois allées identiques disposées selon les médianes d'un triangle équilatéral (**Figure 38**). Les allées ont une longueur de 40 cm, une largeur de 9 cm et une hauteur de 16 cm (Nancy-Plast, Nancy). La structure est faite de plexiglas, les parois des allées sont opaques et le plancher est transparent. Le plancher de chaque allée (A, B et C) est recouvert de formes géométriques visibles par l'animal, destinées à lui servir de repères visuels différents ; les formes affichées étant différentes d'une allée à l'autre.

Le test commence lorsque la souris est introduite dans le labyrinthe, à l'extrémité d'une allée. A partir de ce moment, elle peut évoluer librement dans la structure pendant 5 min.

Son trajet est filmé par une caméra CCD reliée à un ordinateur, qui numérise les déplacements et les enregistre grâce à un logiciel spécifique (VLIR track, Intellibio). Pendant 5 min, chaque entrée de la souris dans un bras est notée, en suivant l'ordre de ses déplacements. L'entrée dans un bras est validée à partir du moment où la patte postérieure de la souris franchit la limite du bras considéré; cette validation étant soumise à l'examen de la vidéo par l'opérateur. Les alternances sont considérées comme correctes lorsque la souris visite successivement les 3 bras du labyrinthe. Le résultat du test est exprimé en pourcentage d'alternances, soit le nombre d'alternances correctes divisé par le nombre total d'alternances possibles multiplié par 100. Ce calcul des résultats est résumé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'alternance} = (\text{Nombre d'alternances} / \text{Nombre d'alternances possibles}) \times 100$$

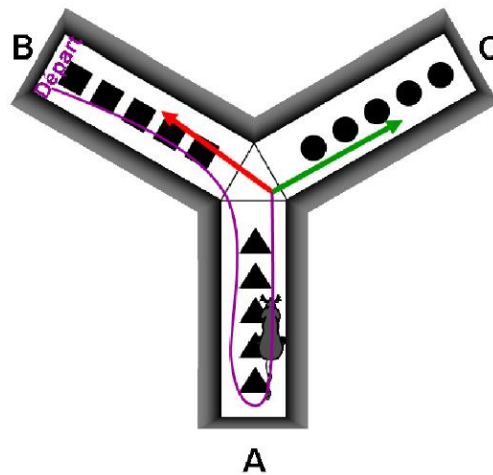


Figure 38 : Labyrinthe en Y (ou Y-maze test)

Ce test étudie la mémoire à court terme. L'appareil est composé de 3 bras (notés A, B et C) en plexiglas noir opaque orientés à 120° les uns par rapport aux autres. Le sol est couvert de figures géométriques constituant autant d'indices permettant à l'animal de se retrouver dans les différents bras. Pendant 5 min, l'animal explore librement le dispositif et la séquence des bras visités est enregistrée à l'aide du système vidéo. L'entrée de l'animal dans un bras est validée lorsque son train arrière passe une ligne fictive située à 5 cm de l'entrée du bras correspondant. Dans cet exemple, l'animal est introduit dans le bras B (**Départ**) et va dans le bras A. Lorsque l'animal repart vers le centre du dispositif, il a alors le choix entre le bras B d'où il vient (flèche **rouge**) et le bras C qu'il n'a pas encore exploré (flèche **verte**). Le choix du bras inexploré conduit à une alternance, soit la séquence B – A – C.

3. Analyses immunohistologiques et immunohistochimiques sur coupes de cerveaux

Pour cette étude, nous avons utilisé 13 blocs de demi cerveaux de souris âgées de 9 mois inclus en paraffine : 7 blocs de souris transgéniques J20 et 6 blocs de leurs témoins sauvages (wild type : WT). Des coupes sagittales des blocs de paraffine de 8 µm d'épaisseur sont faites au microtome au Centre de Pathologie de Dijon. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre et fixées avec de l'albumine diluée au 1/100 dans de l'eau. Les lames ont été égouttées, séchées sur une platine à 58°C puis à l'étuve (2 h à 50°C). Les lames sont ensuite déparaffinées par des passages successifs dans un bain de xylène de 5 min, puis dans deux bains d'éthanol de concentration décroissante (absolu puis 95%) de 5 min.

Pour le marquage immunohistologique, les lames sont incubées pendant 1 h en présence d'une solution de 0,2 % de rouge Congo. Après lavage avec de l'eau distillée, les lames sont lavées avec une solution alcaline d'alcool (1 % NaN₃, 50 % éthanol) puis contre colorées

avec l'hématoxyline et déshydratées à l'éthanol absolue.

Pour le marquage immunohistologique, les lames sont d'abord immergées dans une solution de blocage (Protéine Block serum free, Dako). Après 30 min de saturation, les lames sont lavées 2 fois avec du PBS-T 0,1% puis incubées pendant 1 h, en chambre humide et à température ambiante en présence de 100 µL des anticorps primaires anti-Aβ17-24, anti-Abcd3et anti-Kv3.1b (**Tableau 6**). Les lames sont rincées 2 fois avec du PBS-T 0,1 % puis recouvertes de 100 µL d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase (**Tableau 6**) pendant 1 h, à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les anticorps primaires et secondaires sont dilués dans la solution de saturation. Après lavage des lames avec du PBS-T 0,1%, l'activité peroxydasique est révélée en déposant sur les lames la solution de 3,3'-diaminobenzidine (DAB Chromogen-Substrat, Dako) pendant 30 min et à l'abri de la lumière. Le substrat (DAB) oxydé génère une coloration marron sur le site de l'antigène ciblé. Les lames sont rincées à l'eau du robinet pour éliminer l'excès du substrat. Les noyaux sont contre-colorés par l'hémalum pendant 5 min puis rincés à l'eau du robinet. Après déshydratation par le xylène et l'éthanol, les lamelles sont montées avec le liquide de montage (Dako). Lorsque les lames sont montées à l'automate la procédure est la suivante : de fines gouttes de xylène sont appliquées sur la lame et un film plastique est collé permettant ainsi de protéger le marquage.

Pour chaque anticorps, un témoin négatif est réalisé en omettant l'anticorps primaire afin de valider que les dépôts observés ne sont pas liés au système de révélation (contrôle conjugué).

Les lames sont conservées à 4°C avant d'être observées sous lumière blanche au microscope optique ou à fluorescence (Axioskop, Zeiss) muni d'une caméra haute résolution (Zeiss). Les images obtenues sont digitalisées au moyen d'une caméra AxioCam (Zeiss). Les analyses numériques des photos sont réalisées grâce au logiciel AxioVision (Zeiss).

Tableau 6. Anticorps utilisés en immunohistochimie et conditions techniques

Anticorps	Références commerciales	dilution	solution	Caractéristiques
<i>Anticorps primaires</i>				
A β 17-24	39220 Sigma-Aldrich	1/100	PBST 5% lait	Lapin mono ou polyclonal
Kv3.1b	S16B-8 Sigma-Aldrich	1/100	PBST 1% BSA	Monoclonal de souris
Abcd3	PA1-650 Invitrogen Life Technologie	1/500	PBST 1% BSA	Lapin polyclonal
<i>Anticorps secondaires</i>				
HRP	Santa Cruz	1/5000	PBST 1% lait	Chèvre anti-lapin et anti-souris

4. Analyses du profil lipidique sur plasma et érythrocytes par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Le profil lipidique (acide gras, cholestérol et oxystérols) des souris transgéniques J20 et de leurs témoins WT est analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG – SM). Les analyses qualitatives et quantitatives ont été effectuées à la Plateforme de Lipidomique de l'université de Bourgogne (INSERM UMR866 / LabEx LipSTIC, UFR des Sciences de Santé – Dijon, France).

4.1. Analyse de la composition en acides gras

L'analyse du profil d'acides gras (AG) est réalisée par CPG - SM après dérivation des AG en esters méthyliques correspondant. Les lipides totaux sont extraits à partir de 25 μ L du plasma ou d'érythrocytes. 25 μ L du plasma ou d'érythrocytes des souris sont ajoutés à 25 μ L du mix des AG deutérés, 1,2 mL d'éthanol / Butylhydroxytoluène (BHT) (50 mg/L) (Sigma-Aldrich) et 60 μ L de KOH (10 M) (Sigma-Aldrich). Les échantillons sont incubés pendant 45 min à 56 °C. Après cette étape de saponification, 1 mL d'HCl 1,2 M est ajouté dans le tube et les AG sont extraits avec 3 mL d'Hexane (Sigma-Aldrich). Les tubes sont agités et centrifugés à 1 000 g pendant 5 min. La phase organique (phase hexanique supérieure) est récupérée et séchée sous vide. Ensuite, une étape de dérivation des AG est faite, afin d'avoir des dérivés volatils sous forme de pentafluorobenzyl esters. Pour cela, les extraits secs sont repris par 100 μ L d'acétonitrile contenant 5 μ L de pentafluorobenzyl bromide (Sigma-Aldrich) et 5 μ L de

di-isopropylethylamine (Sigma-Aldrich) et incubés pendant 30 min à 37°C puis les pentafluorobenzyl esters formés sont extraits par 2 mL d'hexane (Sigma-Aldrich) dans 1 mL d'eau désionisée. Les tubes sont agités et centrifugés à 1 000 g pendant 5min. La phase hexanique récupérée est séchée sous vide et l'extrait sec est repris dans 100 µL d'Hexane (Sigma-Aldrich). Une gamme de calibration a été réalisée dans les mêmes conditions de préparation des extraits.

L'analyse des pentafluorobenzyl esters est réalisée par le système CPG - SM. Le chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard était muni d'un injecteur automatique Hewlett Packard HP7683 et couplé à un détecteur de masse Hewlett Packard HP5973. L'injection a été faite en mode Pulsed Split. La colonne capillaire en silice fondue HP-5MS de 30 m x 0,25 mm et 0,25 µm d'épaisseur de film. Le gaz est l'hélium et son débit initial est de 1,1 mL /min. La détection est faite par ionisation chimique négative. La température du four est programmée comme suit : température initiale de 140°C puis une rampe de 5°C /min jusqu'à 300°C. Cette température est maintenue 5 min. le gaz réactif est le méthane. La température de l'interface est de 300°C, celle du quadripôle de 106°C et celle de la source de 150°C. L'acquisition est faite en mode SIM en balayant les ions [M-PFB]

4.2. Analyse de la composition en cholestérol et ses dérivés oxydés (oxystérols)

Dans un tube en verre, 100 µL d'érythrocytes et 50 µL du plasma sont ajustés à 300 µL par la solution physiologique du NaCl 9 g/L et mélangés avec 10 µL d'une solution éthanolique composée de l'épicoprostanol, 7 α OHC_{d7}, 7 β OHC_{d7}, 7 KC_{d7}, 25 OHC_{d6}, 27 OHC_{d6} et 24 S OHC_{d6}, utilisés comme standards internes. Dans chaque tube 1,4 mL EtOH/BHT (50 mg/L) sont ajoutés pour réduire l'oxydation du cholestérol au cours du processus de m'extraction. La saponification est faite par 180 µL de KOH (10 M). Après 1 h d'incubation du mélange à 37°C, 1,5 mL H₂O sont ajouté et les stérols (cholestérol et oxystérols) sont extraits par 5 mL hexane. Les échantillons sont agités 5 min puis centrifugés 5 min à 1500 g. La phase organique supérieure est récupérée et évaporée sous vide. Les extraits secs obtenus sont dissous pendant 30 min à 60°C en présence de 100 µL du mélange Pyridine / HMDS / TMCS (3v: 2v: 1v) préparé extemporanément. Les extraits sont de nouveau évaporés sous vide et repris dans 100 µL d'hexane pour être analysés par CG - MS.

Pour l'analyse par CPG - SM, une calibration est nécessaire. Deux gammes de standards externes sont préparées à partir de 10 ng / µL pour le cholestérol et de 0,1 ng / µL pour les 7 β -OHC, 7 α -OHC, 7-KC, 27-OHC, 25-OHC et 24S-OHC et traités de la même manière que les échantillons depuis l'hydrolyse des esters.

La séparation a été réalisée sur une colonne HP-5MS de 30 m x 0,25 mm et 0,25 µm d'épaisseur de film. Le chromatographe en phase gazeuse est un appareil HP6890 équipé d'un injecteur HP7683 (Agilent des Technologies). Les analyses ont été pratiquées dans les conditions suivantes: gaz vecteur : Hélium, débit colonne : 1,1 mL /min, la température d'injecteur : 250°C. La température du four était programmée de 180°C à 260°C à 10°C/min, puis de 260°C à 280°C à 10°C/min et maintenue à 280°C pendant 5 min. Le chromatographe était couplé à un détecteur de masse à simple quadripôle HP5973. La température de l'interface était de 280°C celle du quadripôle de 150°C et celle de la source de 230°C. L'acquisition a été faite en mode SIM. La détection est faite par ionisation électronique avec une énergie de 70 eV.

L'identification du cholestérol et des oxystérols est basée sur la comparaison de leurs indices de rétention expérimentaux à ceux des standards internes (épicoprostanol ou des contrôles deutérés (d7 ou d6)). La quantification a été faite à partir du rapport entre les surfaces des pics correspondant aux ions choisis pour les composés à doser et à celles des ions choisies pour les étalons internes. Ce rapport a été comparé à des courbes d'étalonnage réalisées dans les mêmes conditions d'analyse à partir de produits standards.

5. Etude clinique

5.1. Recrutement des patients

L'étude a été effectuée après l'obtention du consentement écrit ou oral des patients et des sujets sains. Au total, 64 patients (28 femmes et 36 hommes) d'âge moyen de 65 ± 10 ans et 128 sujets sains (60 femmes et 68 hommes) d'âge: moyen de 72 ± 8 ans ne présentant pas de symptôme ou de signe en faveur d'une pathologie du système nerveux central ou périphérique ont été recrutés à l'hôpital universitaire Fattouma Bourguiba (Monastir, Tunisie). Les sujets témoin ont été recrutés en foyer de soins infirmiers au centre de la Tunisie (Sousse, Madhia et Monastir). Les critères NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer Disease and Related Disorders Association) ont été utilisés.

Les sujets recrutés ont été convoqués et un bilan neuropsychologique détaillé évaluant la mémoire du travail, la mémoire épisodique, les fonctions exécutives, la fluence verbale, les fonctions gnosiques et praxiques et l'humeur a été appliqué à tous les patients. De même, les patients ont subi une imagerie cérébrale (tomodensitométrie (TDM) ou imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM)) et un bilan biologique.

5.2. Préparation des échantillons de sang

Le sang a été recueilli dans des tubes EDTA. Le plasma et les globules rouges ont été séparés par centrifugation des échantillons sanguins à 1 400 g pendant 10 min à +4°C. Les surnageants plasmatiques et sériques ont été récupérés et aliquotés. Le culot cellulaire a été lavé 3 fois en NaCl 0,9 % puis tous les aliquots ont été conservés à -80°C. Pour l'analyse du profil lipidique, les culots érythrocytaires ont été mis en présence d'eau déionisée à +4°C pendant 5 min.

5.3. Analyse du profil d'acide gras plasmatique

Les AG plasmatiques ont été analysés sous la forme d'esters méthyliques d'AG par CPG-SM selon la méthode de **Takemoto *et al.* (2003)**. 100 µL du plasma et 10 µL de standard interne (C17:0 ; 1 mg/mL) ont été mélangés avec 2 mL d'acide hydrochlorique 5% méthanolique, agité au vortex puis incubé pendant 2 h à 100 ° C. Après refroidissement à température ambiante, les dérivés méthyliques ont été extraits deux fois avec 2 mL de n-hexane, séché sous un courant d'azote, et dissous dans 100 µL de n-hexane. 1 µL de chaque échantillon a été injecté dans le système CPG / SM (série II gaz Chromatographie à Hewlett Packard 5890 / Hewlett Packard 5972 MS) équipé du programme HP Chemstation et d'une colonne HP-Innovax (diamètre interne: 250 m, longueur: 30 m, épaisseur du film: 0,25 m; Hewlett-Packard) en mode sans fraction. La température initiale du four était de 100 ° C, puis augmente de 15°C / min jusqu' à 240°C pendant 10 min. La température de l'injecteur est de 240°C et celle de l'analyseur est de 280°C. Les analyses ont été pratiquées dans les conditions suivantes: - gaz vecteur :Hélium - débit colonne : 1,1 mL /min, - mode d'injection : Split et rapport de Split :1/10 ; P 8,9Psi ; EMV 1376V ; PM 70eV. L'acquisition a été faite en mode SIM.

L'identification et la quantification des AG extraits a été faite à partir du rapport entre les surfaces des pics correspondant aux ions choisis pour les composés à doser et à celles des ions choisies pour l'étalon interne. Ce rapport a été comparé à des courbes d'étalonnage réalisées dans les mêmes conditions d'analyse à partir de produits standards.

III. Tests statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism4 (GraphPad Software, Inc). Les tests cellulaires réalisés le plus souvent en triplicate ont été répétés au minimum trois fois. Les analyses statistiques des données ont été faite par le test ANOVA; le

test post-hoc (ou test de comparaisons multiples) a été utilisé pour déterminer les différences significatives entre les moyennes de groupes de traitement. Le calcul des corrélations a été effectués par le test de Pearson. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD. Les différences sont considérées comme étant significatives quand $p < 0,05$.

Pour l'étude électrophysiologique, il a été nécessaire d'effectuer un grand nombre d'enregistrements sur des ovocytes différents pour minimiser l'impact d'une part de la variabilité biologique et d'autre part des imprécisions expérimentales. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Les comparaisons statistiques pour les différentes mesures sont réalisées:

RÉSULTATS

A. Etude *in vitro* sur cellules 158N et BV-2

Une partie de ce travail a fait l'objet de deux publications dans les journaux :

Chemistry and Physics of Lipids «Evidence of K⁺ homeostasis disruption in cellular dysfunction triggered by 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol, and tetracosanoic acid (C24:0) in 158N murine oligodendrocytes: exacerbation of lipotoxicity by the universal Kv channel blocker, 4-aminopyridine», parue en Mars 2017;10.1016/j.chemphyslip.2017.03.00

Journal of Cellular Biochemistry « Modulation of Kv3.1b potassium channel expression and intracellular potassium level in 158N murine oligodendrocytes and BV-2 murine microglial cell treated with 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid (C24:0) », en révision , 2017.

CONTEXTE

Les oxystérols, principalement, le 7KC et le 24S-OHC ainsi que les AGTLC (C24:0, C26:0) participent à l'éthologie du vieillissement et de nombreuses maladies neurodégénératives telles que la MA, la sclérose en plaques, la maladie de Parkinson, l'X-ALD, la maladie de Huntington et la maladie du Niemann-Pick (Björkhem, 2006; Zarrouk *et al.*, 2014; Novakova *et al.*, 2015; Zhornitsky *et al.*, 2016; Testa *et al.*, 2016; Doria *et al.*, 2016; Petrov *et al.*, 2016). Une altération de l'homéostasie du potassium (K⁺) a été relatée chez des patients atteints de MA et de sclérose en plaques.

APPROCHE EXPERIMENTALE

Les cellules 158N et BV-2 ont été cultivées en présence et en absence de 7KC (2,5; 12,5 et 25 µM), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 µM) ou C24:0 (1; 5; 10 et 20 µM). La lipotoxicité de ses dérivés, leur impact sur l'homéostasie potassique et en particulier sur l'expression de Kv3.1 ont été évalués par différentes approches.

1. Evaluation de la cytotoxicité du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur des cellules 158N et BV-2 : Impact sur la concentration du potassium intracellulaire

Afin d'étudier la relation entre la [K⁺]_i et les effets cytotoxiques du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur les oligodendrocytes murins 158N et les cellules microgliales murines BV-2, nous avons, tout d'abord, évalué leurs effets cytotoxiques. Pour cela, différents paramètres ont été étudiés: prolifération et viabilité cellulaire, potentiel transmembranaire mitochondrial et pouvoir oxydant. L'impact de ces composés sur la [K⁺]_i, l'organisation de la membrane plasmique et le potentiel membranaire a aussi été évalué par différentes approches : spectrofluorimétrie,

photométrie à flamme et cytométrie en flux. La 4-AP a été utilisée pour évaluer la contribution des Kv dans la lipotoxicité induite par le 7KC, 24S-OHC et C24:0.

1.1. Effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur la prolifération et la viabilité cellulaire

Les effets du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur la prolifération et la viabilité cellulaire ont été évalués en prenant en compte la morphologie, la prolifération des cellules par microscopie en contraste de phase, le comptage par cytométrie en flux et la détermination de la viabilité cellulaire par coloration au bleu trypan et à l'IP.

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

Après 24 h d'incubation dans des plaques 12 puits, le milieu de culture des 158N ou des BV-2 a été supplémenté par du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1; 5; 10 et 20 μ M) pendant 24 et / ou 48 h. L'observation des cellules dans chaque condition par microscopie en contraste de phase, nous a permis d'évaluer qualitativement l'adhérence et la morphologie des cellules (taille, contour du cytoplasme et regroupement ou non des cellules en amas). Comparativement aux cellules non traitées (contrôle), le traitement des cellules 158N avec du 7KC (12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (10 et 20 μ M) pendant 24 h induit une diminution dose dépendante de la densité cellulaire et une augmentation du nombre des cellules flottantes (cellules arrondies réfringentes) considérées comme des cellules mourantes ou des cellules mortes. Les cellules non traitées (contrôle) ou traitées par le véhicule (éthanol ou α -cyclodextrine) sont bien étalées et adhérentes (**Figure 39**).

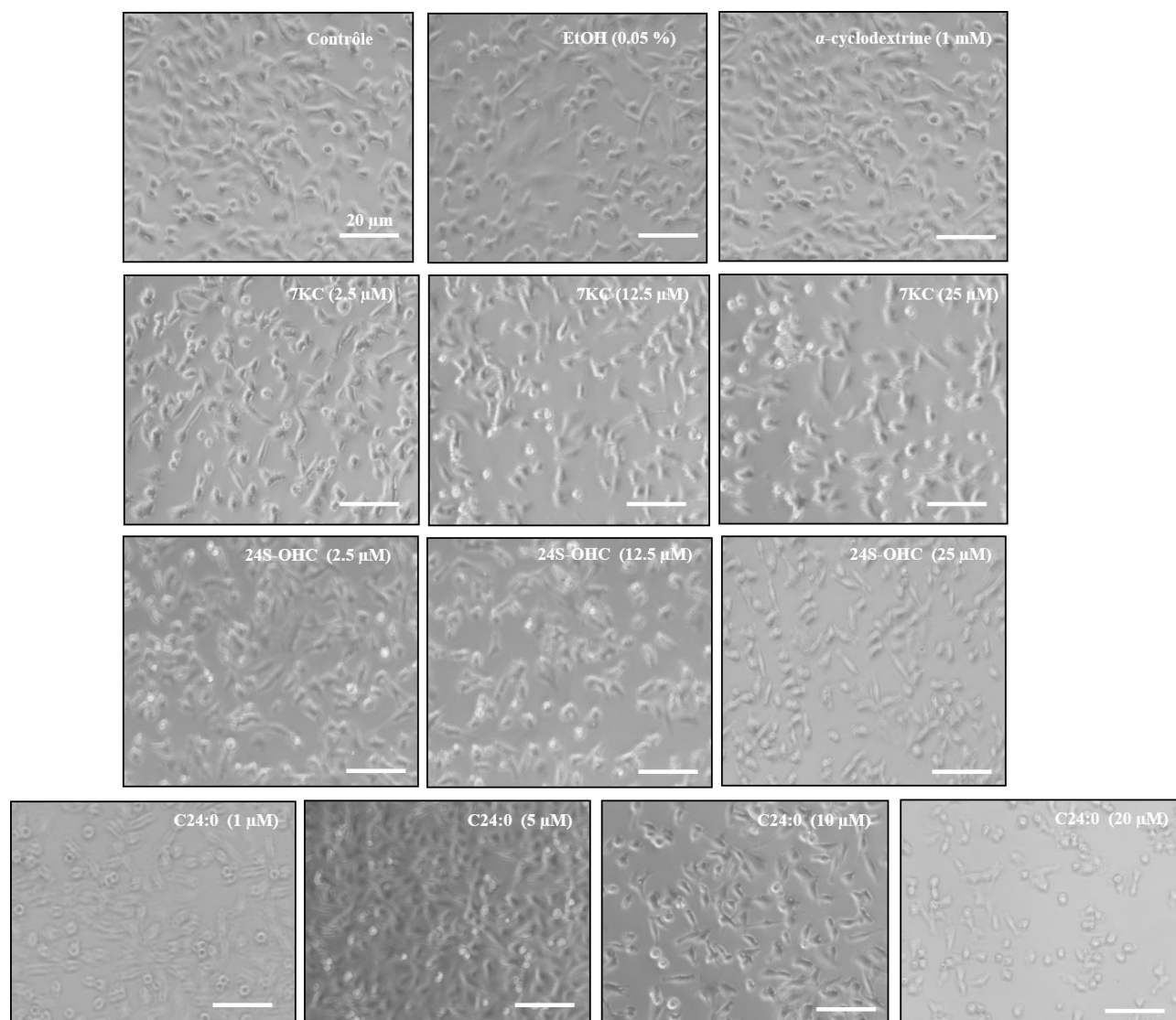


Figure 39 : Observation des cellules 158N par microscopie en contraste de phase.

Les cellules 158N sont traitées pendant 24h avec du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μM) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM) puis observées en microscopie en contraste de phase.

Ces critères de cytotoxicité, dose dépendante, ont été aussi observés sur cellules BV-2 traitées par du 7KC (12,5 et 25 μM), 24S-OHC (12,5 et 25 μM) ou C24:0 (10 et 20 μM) pendant 24 ou 48 h. La morphologie des cellules BV-2 contrôles ou traitées avec le véhicule ne présente pas des changements marqués (**Figure 40**).

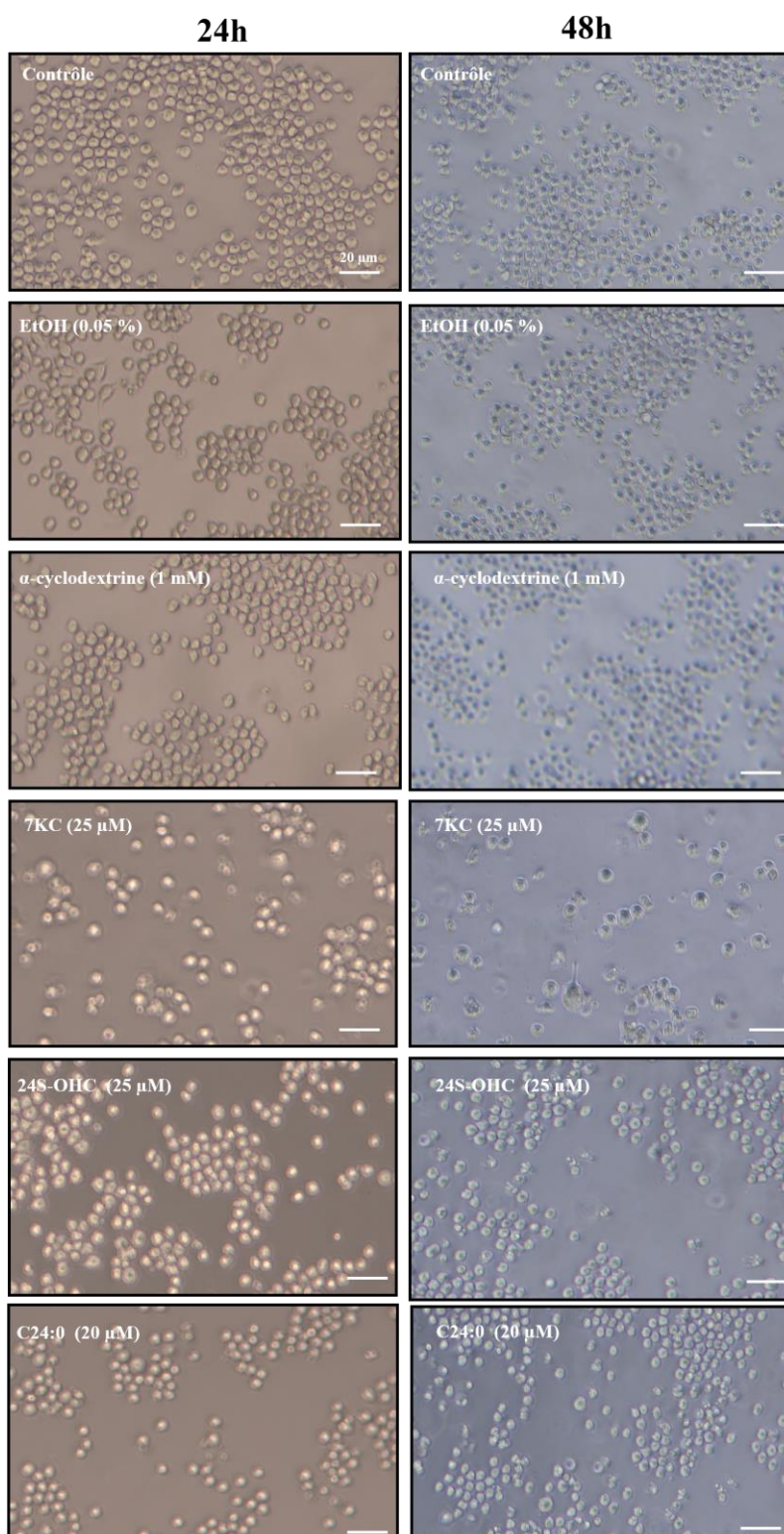


Figure 40 : Observation des cellules BV-2 par microscopie en contraste de phase

Les cellules BV-2 sont traitées pendant 24 et 48h avec du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μM) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM). Elles ont été observées par microscopie en contraste de phase.

✓ Dénombrement des cellules par cytométrie en flux

Dans les conditions de traitement des cellules 158N et BV-2 avec du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), du 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 μM) et du C24:0 (1 ; 5 ; 10 et 20 μM) pendant 24 et / ou 48 h, les cellules adhérentes et non adhérentes sont récupérées. A l'issue de chaque condition de traitement, le nombre total de cellules par puits de plaque 12 puits a été déterminé par comptage au cytomètre en flux. Une réduction marquée et dose dépendante du nombre total de cellules est observée sur les 158N suite au traitement par le 7KC (12,5 et 25 μM), le 24S-OHC (12,5 et 25 μM) et le C24:0 (10 et 20 μM) (**Figure 41**).

La diminution du nombre total de cellules BV-2, après 24 h du traitement, n'est significative qu'en présence du 7KC (25 μM), de 24S-OHC (12,5 et 25 μM) et de C24 (20 μM) (**Figure 41**). Après 48 h de traitement, le nombre total de cellules BV-2 non traitées passe de $1,02 \pm 0,04 \times 10^6$ cellules / mL à $2,06 \pm 0,16 \times 10^6$ cellules / mL et le nombre des cellules BV-2 est réduit à partir de la concentration 12,5 μM pour le 7KC et de 10 μM pour le C24:0 (**Figure 41**). La cytotoxicité du 7KC, 24S-OHC et C24 sur les BV-2 est donc plus importante à 48 h qu'à 24 h.

Le traitement par l' α -cyclodextrine ou l'éthanol (utilisés comme véhicules) ne montre pas d'effet significatif sur le nombre de cellules (**Figure 41**).

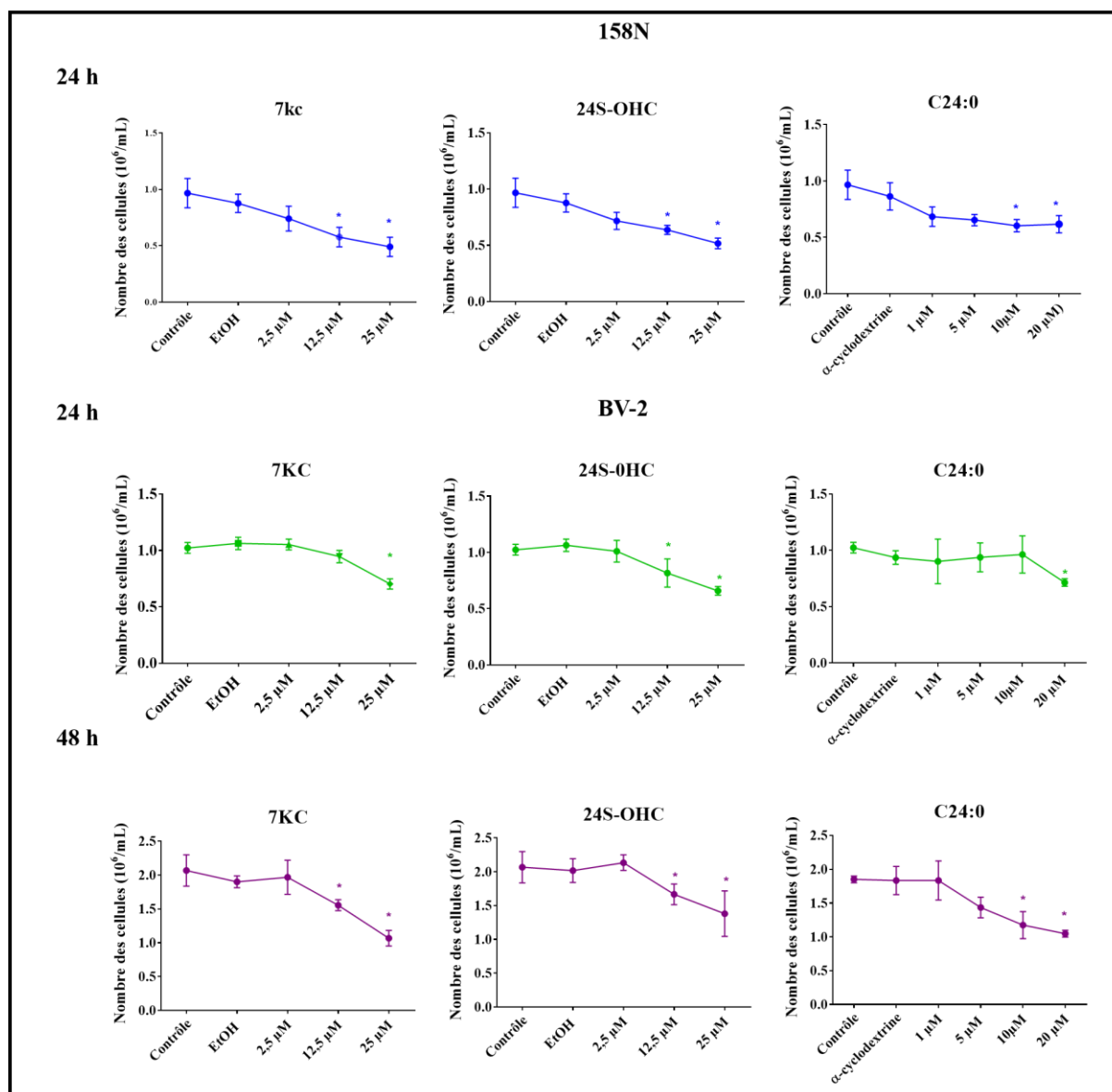


Figure 41 : Effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur la prolifération cellulaire

Les cellules 158N et BV-2 ont été incubées pendant 24 et / ou 48 h en présence 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μM) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM). Le nombre total de cellules est déterminé par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SD ; ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate. La significativité entre véhicule (EtOH et l' α -cyclodextrine) et cellules traitées avec 7KC, 24S-OHC ou C24:0 est calculée par un test Anova (Sidak's multiple comparisons); * $p < 0,05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0 / véhicule. Aucune différence significative n'a été montrée entre contrôle et véhicule.

✓ Numération cellulaire en présence de bleu trypan

La viabilité cellulaire est évaluée par exclusion du bleu trypan. Après 24 et/ ou 48 h de traitement des cellules 158N et BV-2 en absence ou en présence de 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM),

24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μM) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM), les cellules adhérentes et non adhérentes ont été collectées, colorées au bleu trypan et un comptage des cellules totales (vivantes et mortes) a été effectué. Les pourcentages des cellules mortes sont représentés dans la **Figure 42**.

Les résultats concernant les cellules 158N et BV-2 ont montré que le 7KC, le 24S-OHC et le C24:0 induisent une cytotoxicité sur ces deux lignées cellulaires avec un effet dose. Le traitement des cellules BV-2 pendant 48 h n'amplifie pas la toxicité observée à 24 h (**Figures 41-42**)

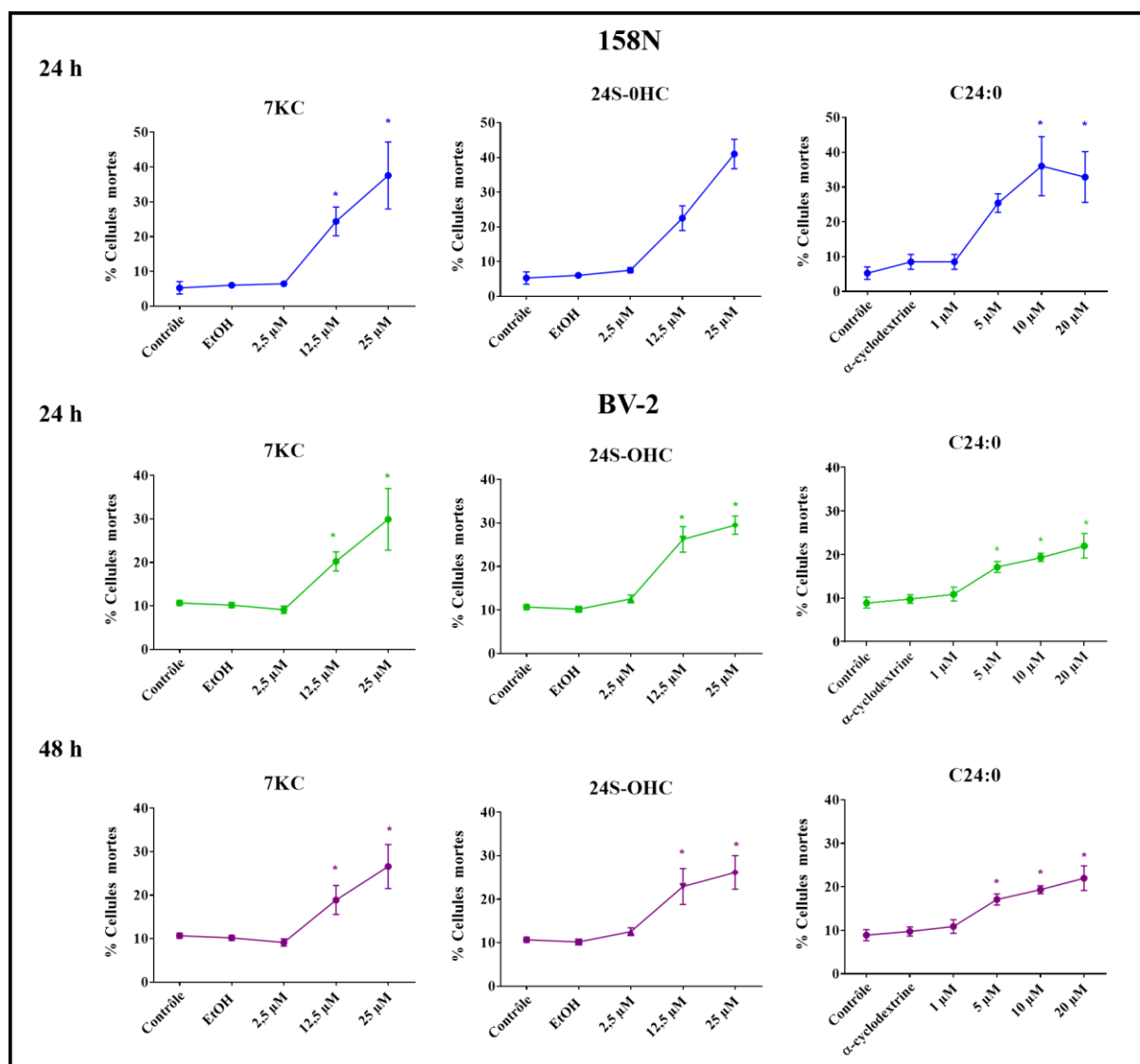


Figure 42 : Numération des cellules mortes en présence du 7KC, 24S-OHC et C24:0

Les cellules 158N et BV-2 ont été incubées pendant 24 et / ou 48h en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μM) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM). Les pourcentages des cellules mortes sont déterminés par coloration au bleu de Trypan et

présentés sous forme de moyenne \pm SD ; ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate. La significativité entre véhicule (EtOH et l' α -cyclodextrine) et cellules traitées avec 7KC, 24S-OHC ou C24:0 est calculée par un test Anova (Sidak's multiple comparisons); * $p < 0,05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0 / véhicule. Aucune différence significative n'a été montrée entre contrôle et véhicule.

✓ Quantification des cellules mortes par coloration à l'iodure de propidium

L'iodure de propidium (IP) est un intercalant de l'ADN qui ne pénètre que dans les cellules dont la membrane plasmique est perméabilisée pouvant correspondre à des cellules mortes. Les effets du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M) sur la perméabilité membranaire des cellules 158N à l'IP a été évaluée après 24h de traitement, celles des BV-2 a été déterminée après 24 et 48h.

Les pourcentages de cellules IP positives (IP+) en présence de 7KC, 24S-OHC et C24:0 augmente en fonction de la concentration (**Figure 43 et 44**).

Le traitement des cellules 158N est associé d'une façon dose dépendante à une augmentation des cellules perméables à l'IP et ce dès 2,5 μ M de 7KC et 24S-OHC, et dès 10 μ M de C24:0. Le pourcentage le plus élevé est observé suite au traitement avec le 24S-OHC. En présence d'éthanol et d' α -cyclodextrine, le pourcentage de cellules IP positives est semblable à celui du contrôle

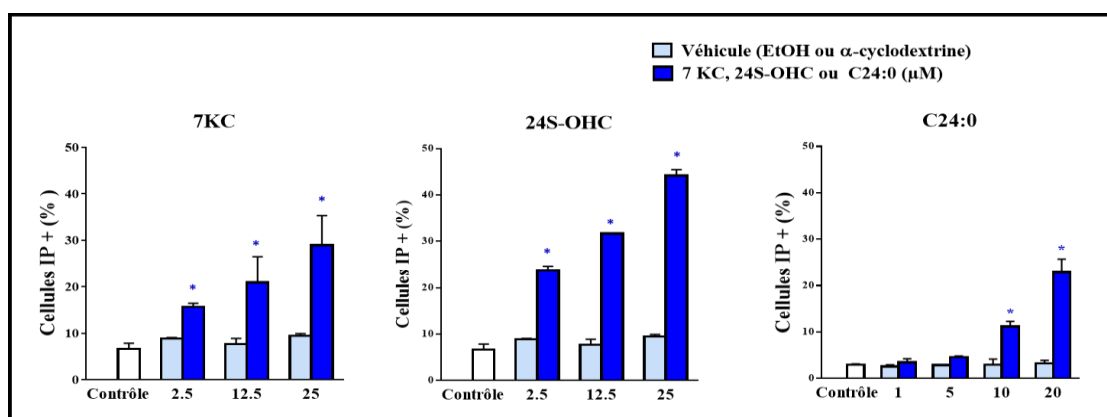


Figure 43 : Effets du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique des oligodendrocytes murins 158N.

Les cellules ont été incubées pendant 24 h en absence ou en présence de 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M). Le pourcentage des cellules IP positives (IP+) est déterminé par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD ; ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en

triplicate. La significativité entre véhicule (EtOH et l' α -cyclodextrine) et cellules traitées avec 7KC, 24S-OHC ou C24:0 est calculée par un test Anova (Sidak's multiple comparisons); * $p < 0,05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0 / véhicule. Aucune différence significative n'a été montrée entre contrôle et véhicule.

Les effets du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1; 5;10 et 20 μ M) sur la perméabilité membranaire à l'IP des cellules BV-2 ont été étudiés à 24 et 48 h. Une augmentation dose dépendante des cellules IP positives a été observée en présence des différents composés testés. Cette augmentation est significative dès 12.5 μ M de 7KC et 24S-OHC ; avec le C24:0, le pourcentage des cellules IP positives n'est significatif qu'à 20 μ M.

Comme le montre la **Figure 39**, le traitement des cellules BV-2 par le 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M) pendant 48 h n'est pas associé d'une façon dépendante du temps à une augmentation du pourcentage des cellules perméables à l'IP. En Effet, après 48h de traitement, nous n'avons observé aucune modification significative du pourcentage de cellules IP+ comparativement aux pourcentages déterminés après 24 h de traitement. L'éthanol et l' α -cyclodextrine ne modifient pas la perméabilité des BV-2 à l'IP.

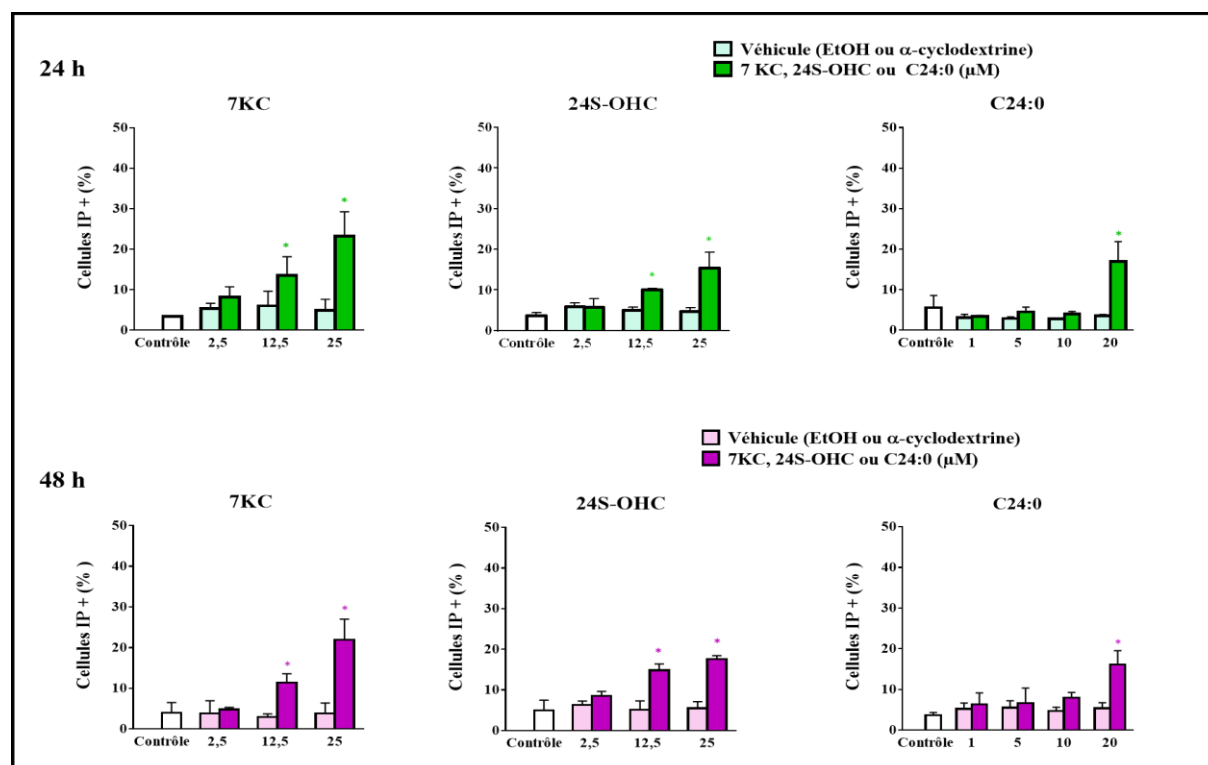


Figure 44 : Effets du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique des cellules microgliales murines BV-2

Les cellules ont été incubées pendant 24 h en absence ou en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μM) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM). Le pourcentage des cellules IP positive (IP+) est déterminé par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD ; ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate. La significativité entre véhicule (EtOH et l' α -cyclodextrine) et cellules traitées avec 7KC, 24S-OHC ou C24:0 est calculée par un test Anova (Sidak's multiple comparisons); * $p < 0,05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0 / véhicule. Aucune différence significative n'a été montrée entre contrôle et véhicule.

1.2. Evaluation des effets du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur le potentiel transmembranaire mitochondrial

Le changement de la polarité mitochondriale témoigne d'un désordre de l'activité métabolique mitochondriale et de l'initiation du processus de mort cellulaire. Le potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) a été évalué par coloration au DiOC₆(3) et analysé par cytométrie en flux.

Les cellules 158N et BV-2, ont été cultivées dans des plaques 12 puits pendant 24 h puis traitées avec le 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μM) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM). A la fin du traitement, le potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) a été mesuré par coloration au DiOC₆(3).

L'analyse par cytométrie en flux montre une augmentation marquée et dose dépendante du pourcentage des cellules avec mitochondries dépolarisées. L'augmentation de cellules avec mitochondries dépolarisées est statistiquement significative à partir de 2,5 μM de 7KC et 24S-OHC et à partir de 5 μM de C24:0. Aucune différence significative des pourcentages de cellules avec mitochondries dépolarisées n'a été observée entre les cellules contrôle et les cellules traitées avec l'éthanol ou l' α -cyclodextrine (**Figure 45**).

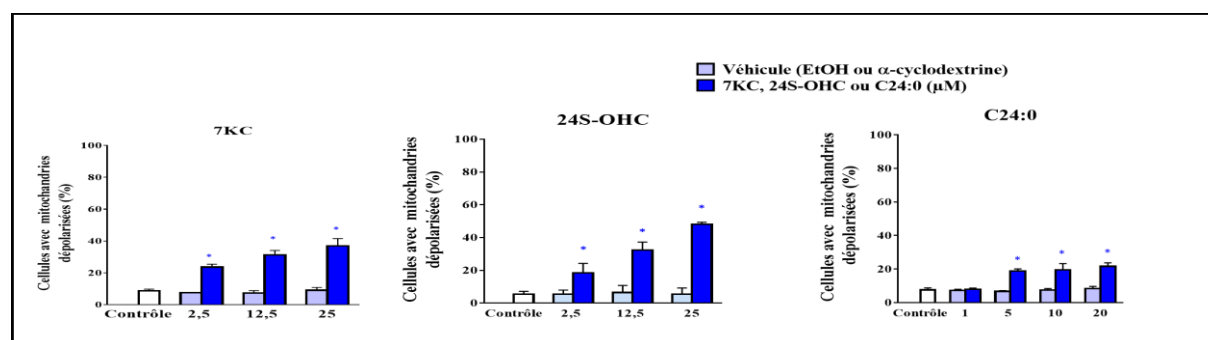


Figure 45 : Effets du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur le potentiel transmembranaire mitochondrial des oligodendrocytes murins 158N

*Les cellules ont été incubées pendant 24 h en absence ou en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M). Le pourcentage de cellules avec mitochondries dépolarisées est déterminé par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD ; ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate. La significativité entre véhicule (EtOH et l' α -cyclodextrine) et cellules traitées avec 7KC, 24S-OHC ou C24:0 est calculée par un test Anova (Sidak's multiple comparisons); * $p < 0,05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0 / véhicule. Aucune différence significative n'a été montrée entre contrôle et véhicule.*

Le 7KC, 24S-OHC et C24:0 induisent aussi une dépolarisation mitochondriale des cellules BV-2 après 24 h de traitement. La dépolarisation observée est moins importante que celle observée sur cellules 158N. L'augmentation du pourcentage de cellules avec mitochondries dépolarisées n'est observée qu'à partir de 12,5 μ M de 7KC ou de 24S-OHC et à partir de 20 μ M de C24:0.

Après 48 h de traitement, la mesure de l'intensité fluorescente du DiOC₆(3) sur BV-2, met en évidence une augmentation du pourcentage des cellules avec des mitochondries dépolarisées en présence de 7KC (12,5 et 25 μ M). Aucune différence significative des pourcentages de cellules avec mitochondries dépolarisées n'a été observée entre 24 et 48 h de traitement avec le 24S-OHC et le C24:0 (**Figure 46**).

Par rapport aux cellules non traitées, l'éthanol et l' α -cyclodextrine ne montrent pas de différences significatives des pourcentages de cellules avec mitochondries dépolarisées après 24 et 48 h de traitement (**Figure 46**).

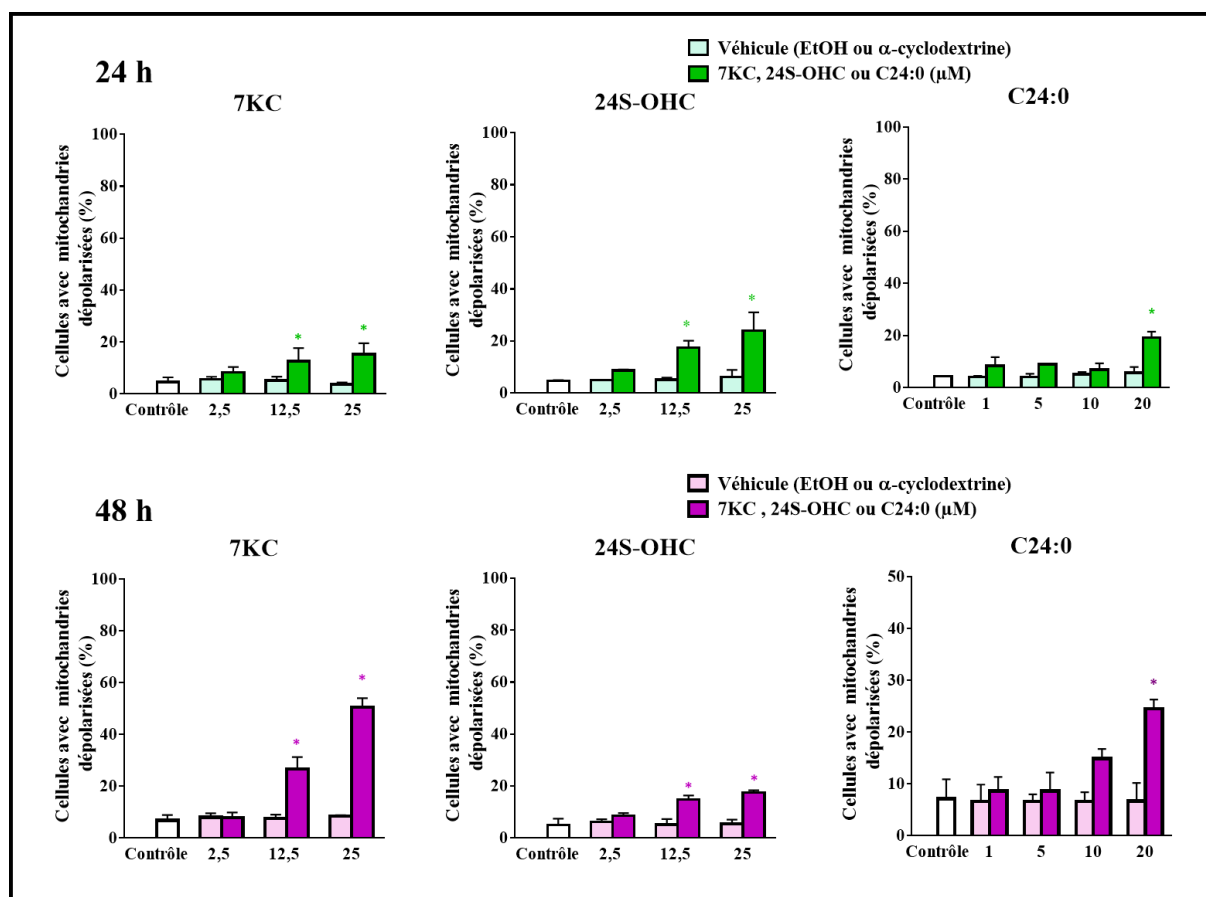


Figure 46 : Effets du 7KC, du 24S-OHC et du C24:0 sur le potentiel transmembranaire mitochondrial des cellules microgliales murines BV-2

Les cellules ont été incubées pendant 24 et /ou 48 h en absence ou en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μM) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM). Les pourcentages des cellules avec mitochondries dépolarisées ont été déterminés par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD ; ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate. La significativité entre véhicule (EtOH et l' α -cyclodextrine) et cellules traitées avec 7KC, 24S-OHC ou C24:0 est calculée par un test Anova (Sidak's multiple comparisons); * $p < 0,05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0 / véhicule. Aucune différence significative n'a été montrée entre contrôle et véhicule.

1.3. Evaluation du stress oxydant induit par le 7KC, 24S-OHC et C24:0

Comme le stress oxydant peut être initié avant la dépolarisation transmembranaire mitochondriale et qu'il s'accroît après la chute de $\Delta\Psi_m$, nous avons quantifié les effets du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur la surproduction de radicaux oxygénés.

Les anions superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) produits par les cellules 158N et BV-2 traitées par le 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μM) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM) ont été mesurés

par cytométrie en flux après coloration à la DHE.

L'incubation de cellules 158N avec 7KC, 24S-OHCet C24:0, pendant 24 h, induit une surproduction d' $O_2^{\bullet-}$ dose dépendante. Celle-ci est statistiquement significative à partir de 2,5 μ M de traitement avec 7KC et 24S-OHC et à partir de 10 μ M avec C24:0. Aucune différence significative du taux intracellulaire d' $O_2^{\bullet-}$ n'a été observée entre les cellules contrôle et les cellules traitées par l'éthanol ou l' α -cyclodextrine (**Figure 47**).

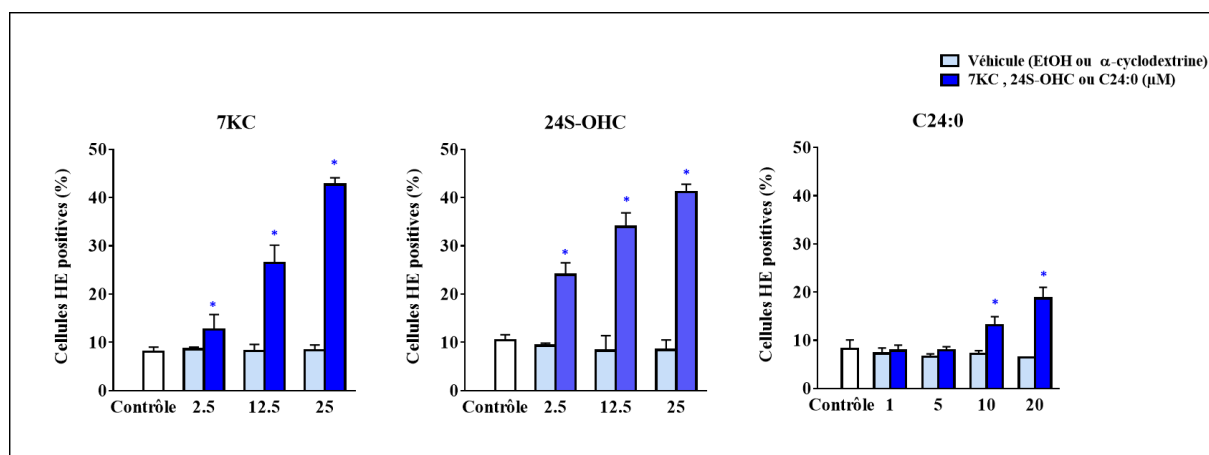


Figure 47 : Mesure de la production d'anions superoxydes intracellulaires sur des oligodendrocytes murins 158N

Les cellules ont été incubées pendant 24 et /ou 48 h en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M). Le pourcentage des cellules HE positives est déterminé par cytométrie en flux et les résultats sont présentés en moyenne \pm SD ; ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate. La significativité entre véhicule (EtOH et l' α -cyclodextrine) et cellules traitées avec 7KC, 24S-OHC ou C24:0 est calculée par un test Anova (Sidak's multiple comparisons); * $p < 0,05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0 / véhicule. Aucune différence significative n'a été montrée entre contrôle et véhicule.

Sur les cellules BV-2, après 24h de traitement, l'augmentation de la production d' $O_2^{\bullet-}$ est statistiquement significative à partir de 12,5 μ M de 7KC et 24S-OHC et à partir de 10 μ M de C24:0. Après 48 h de traitement, le pourcentage des cellules BV-2 HE positives (surproduisant des anions superoxydes) augmente à partir de 2,5 μ M en présence de 7KC et à partir de 10 μ M en présence de C24:0. Le pourcentage de cellules HE positives mesuré en présence de 24S-OHC ne montre pas de différence entre 24 et 48 h (**Figure 48**). Aucune différence n'a été observée entre les cellules contrôles et les cellules traitées avec les véhicules après 24 et 48 h de traitement (**Figure 48**).

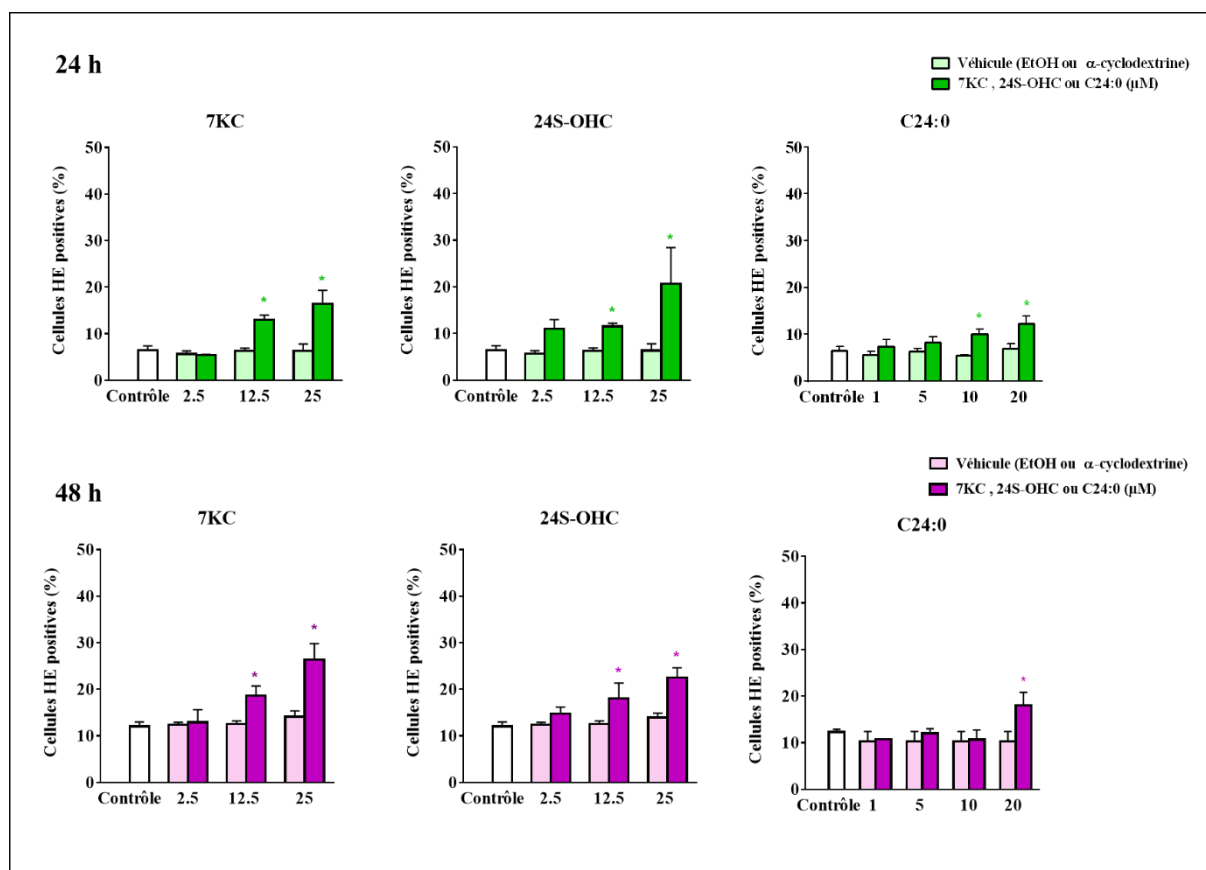


Figure 48 : Mesure de la production d'anions superoxydes sur des cellules microgliales murines BV-2

Les cellules ont été incubées pendant 24 et /ou 48 h en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M). Le pourcentage des cellules HE positives (surproduisant des anions superoxydes) a été défini par cytométrie en flux et les résultats sont présentés en moyenne \pm SD ; ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate. La significativité entre véhicule (EtOH et l' α -cyclodextrine) et cellules traitées avec 7KC, 24S-OHC ou C24:0 est calculée par un test Anova (Sidak's multiple comparisons); * $p < 0,05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0 / véhicule. Aucune différence significative n'a été montrée entre contrôle et véhicule.

1.4. Effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur la concentration intracellulaire de potassium

1.4.1. Mesure du potassium intracellulaire par photométrie de flamme

Les ions K^+ participent à l'établissement et à la modulation du potentiel électrique membranaire, à la régulation du volume cellulaire et au transport de divers ions et molécules organiques. Les liens entre la mort cellulaire et K^+ sous l'effet d'AGTLC ou de dérivés

oxydés du cholestérol restent à définir. Ceci nous a mené à étudier l'impact du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur l'homéostasie potassique.

La $[K^+]_i$ a été mesurée par la méthode de photométrie de flamme, technique couramment utilisée pour l'analyse de routine de K^+ . La $[K^+]_i$ mesurée a été normalisée par rapport au nombre de cellules dans chaque condition de culture. Les données correspondent au rapport ($[K^+]_i$ dans l'essai rapporté au nombre correspondant de cellules / $[K^+]_i$ dans les cellules non traitées (contrôle) rapporté au nombre correspondant de cellules).

Les cellules 158N sont traitées pendant 24 h avec du 7KC (2,5 ; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M). En fin d'incubation, les cellules flottantes et adhérentes sont récupérées, lysées et la concentration cytoplasmique de potassium a été analysée. Nous avons vérifié que la 4-AP (2 mM), utilisée pour bloquer les Kv, induit une rétention intracellulaire du K^+ ; la 4-AP sert de contrôle positif.

Nous avons observé que le 7KC et le 24S-OHC entraînaient une augmentation de $[K^+]_i$ dès 2,5 μ M et que le C24:0 augmentait la $[K^+]_i$ à partir de 5 μ M comparativement aux concentrations correspondantes en véhicules (**Figure 49**). Toutefois, l'augmentation du $[K^+]_i$ induite par le 24S-OHC est plus importante que celle induite par le 7KC, la $[K^+]_i$ mesurée en présence de C24:0 est moins importante que celle des oxystérols (7KC et 24S-OHC) (**Figure 49**). Les véhicules utilisés pour solubiliser les oxystérols (EtOH (0,005 % ; 0,025 % ; 0,05 %)) ou pour solubiliser le C24:0 (α -cyclodextrine (1 mM) n'entraînent pas de modifications du contenu en K^+ à l'exception de l'éthanol (0,05 %) qui augmente la $[K^+]_i$ de 49 ± 2 % comparativement aux cellules contrôle.

Les cellules microgliales BV-2 cultivées pendant 24 h avec du 7KC (2,5 ; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M) ne montrent qu'une faible augmentation significative de la $[K^+]_i$ qu'à 25 μ M de 7KC et de 24S-OHC et qu'à 20 μ M de C24:0 (**Figure 49**). Ces variations de la $[K^+]_i$, observées après 24 h de traitement ne sont plus significatives après 48 h de traitement avec 7KC et 24S-OHC ; seule la $[K^+]_i$ en présence de C24:0 (20 μ M) est significativement augmentée (**Figure 49**).

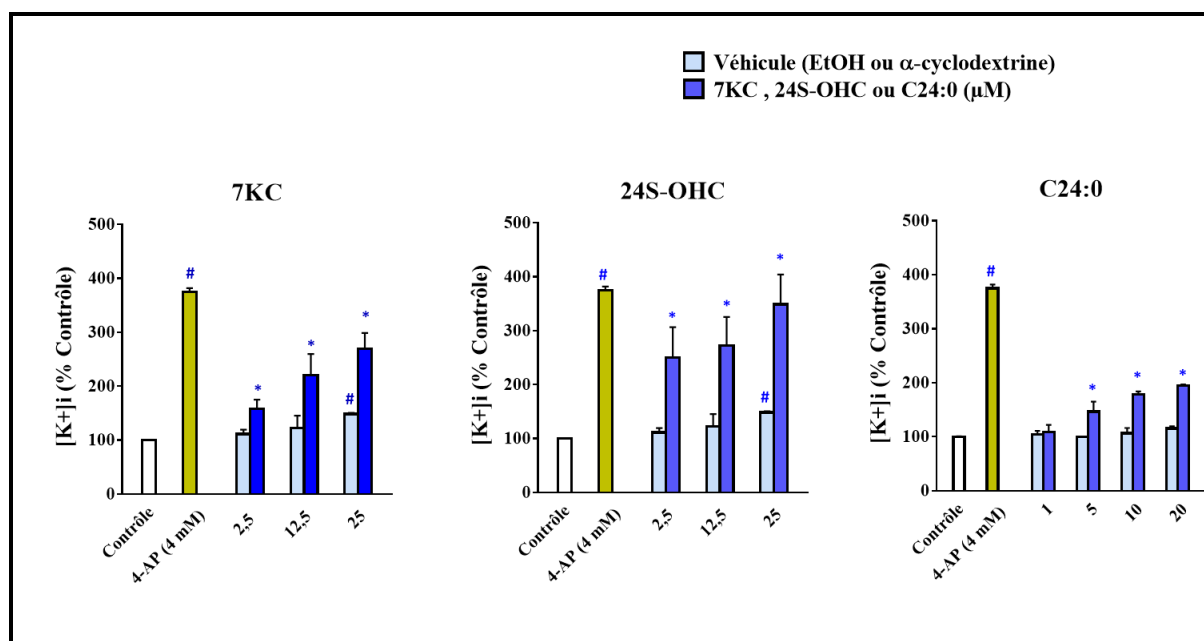


Figure 49 : Effets de 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur la concentration intracellulaire du K⁺ ([K⁺]_i) mesurée par photométrie de flamme

Les oligodendrocytes murins 158N et les cellules microgliales murines BV-2 ont été incubées en présence de 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μM) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM). Les variations de la [K⁺]_i ont été évaluées par photométrie de flamme. Pour chaque condition de traitement, la concentration du K⁺ est normalisée par rapport au nombre de cellules. Les résultats sont présentés en moyenne ± SD; ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate. Les significativités entre les cellules non traitées (contrôles), traitées par les véhicules (EtOH et l'α-cyclodextrine), 4-AP ou 7KC, 24S-OHC ou C24:0 sont calculées par le test ANOVA (Tukey's multiple comparisons); # $p < 0.05$, véhicule ou 4-AP / contrôle et * $p < 0.05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0 / véhicule.

L'analyse de la variation de ([K⁺]_i) en présence du 7KC, 24S-OHC et C24:0 par photométrie de flamme a été évaluée sur l'ensemble des cellules 158N et BV-2 issues de traitement (cellules vivantes, mourantes et mortes).

Etant donné que le 7KC, 24S-OHC et C24:0 provoquent une diminution du pouvoir d'adhésion associée à une diminution de viabilité cellulaire dès 24 h, nous avons ensuite utilisé la technique de fluorimétrie avec la sonde PBFI-AM pour évaluer la contribution de ces composés sur la [K⁺]_i lors du processus de mort cellulaire sur les cellules 158N.

1.4.2. Mesure du potassium intracellulaire avec le fluorochrome PBFI-AM

L'impact de 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur le niveau intracellulaire de K⁺ a été également

évalué par la sonde fluorescente PBF1-AM. Cette sonde ratiométrique présentant une forte affinité pour le K^+ , franchit la membrane cellulaire grâce à un groupement ester d'acétométhoxyl (AM). Une fois dans les cellules, la liaison PBF1-AM est coupée par des estérases empêchant ainsi la sonde d'être relarguée dans le milieu extracellulaire. De ce fait, le rapport de fluorescences émises aux excitations de 340 nm et 380 nm permet de mesurer la quantité de K^+ intracellulaire dans les cellules adhérentes.

Les cellules 158N sont traitées avec 7KC (2,5 ; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M). La 4-AP (4 mM) a été utilisée comme témoin positif pour favoriser l'accumulation intracellulaire de K^+ . Après 24 h de traitement, les cellules flottantes sont éliminées et les adhérentes sont incubées pendant 2 h avec la sonde PBF1-AM. La fluorescence émise par la sonde à 510 nm en réponse à une double excitation à 340 et à 380 nm est mesurée par fluorimétrie.

Comme le montre la **Figure 50**, des taux intracellulaire de K^+ plus élevés ont été observés sur les cellules adhérentes avec le 7KC (25 μ M) et 24S-OHC (25 μ M) comparativement aux véhicules (éthanol 0,025%, éthanol 0,05% et α -cyclodextrine (1 mM)). Aucune modification significative de l'intensité de la fluorescence n'est révélée entre cellules contrôles et cellules traitées avec α -cyclodextrine ou éthanol (**Figure 50**).

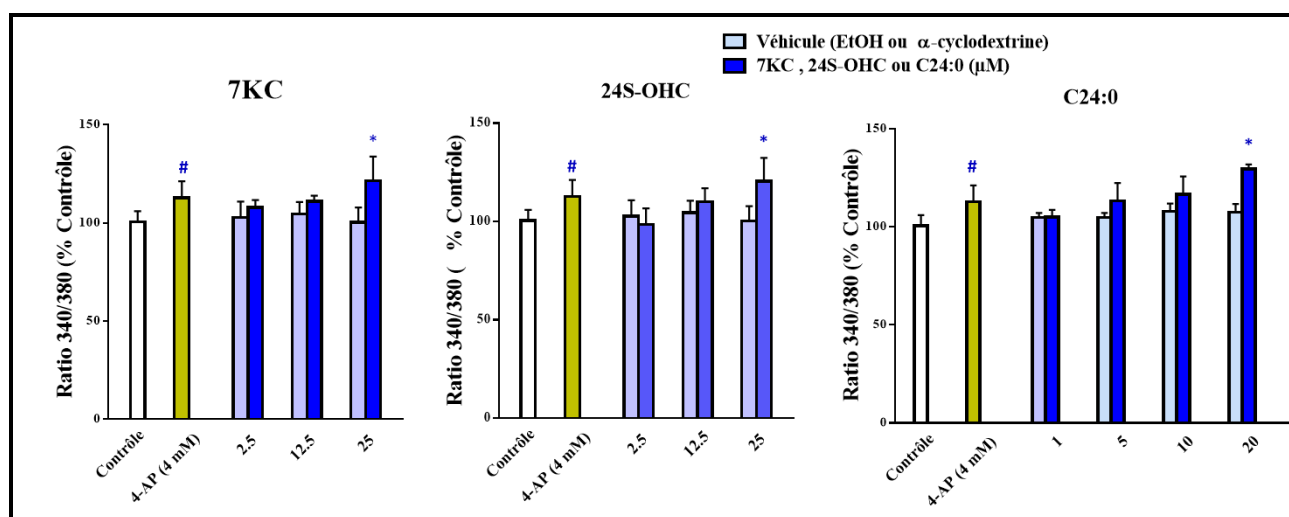


Figure 50 : Effets de 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur la concentration intracellulaire du K^+ ($[K^+]_i$) mesurée avec la sonde PBF1-AM.

Les oligodendrocytes murins 158N ont été incubés pendant 24 h en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M). Les variations de la $[K^+]_i$ ont été estimées par approche ratiométrique en utilisant la sonde PBF1-AM. Le

rapport de fluorescence émise à 510 en excitant à 340 nm et à 380 nm a été mesuré pour chaque condition. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD; ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate. Les significativités entre les cellules non traitées (contrôles), traitées par les véhicules (EtOH et l' α -cyclodextrine), 4-AP ou 7KC, 24S-OHC ou C24:0 sont calculées par le test Anova (Tukey's multiple comparisons); # $p < 0,05$, véhicule ou 4-AP / contrôle et * $p < 0,05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0 / véhicule.

1.5. Evaluation de corrélation entre la concentration intracellulaire du potassium et la cytotoxicité du 7KC, 24S-OHC et C24:0

Afin de savoir si les variations de la $[K^+]_i$ induites par le 7KC, 24S-OHC et C24:0 étaient corrélées à la perte de la viabilité cellulaire observée sur les 158N et les BV-2, nous avons analysé les corrélations entre la $[K^+]_i$ (mesurée par photométrie de flamme), la dépolarisation mitochondriale, la surproduction de $O_2^{\bullet-}$ et la perméabilité à l'iodure de propidium. Pour les cellules 158N et BV-2 traitées, pendant 24 et / ou 48 h, en absence ou en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M), l'analyse des corrélations entre la $[K^+]_i$ et le pourcentage de cellules DiOC₆(3) négatives, HE positives et IP positives a montré une corrélation positive quels que soient les paramètres analysés. Les cellules BV-2 traitées pendant 48 h montrent une corrélation positive entre la $[K^+]_i$ et les différents paramètres en présence du 7KC et C24:0 ; par contre les corrélations en présence du 24S-OHC ne sont pas significatives (**Figure 51**).

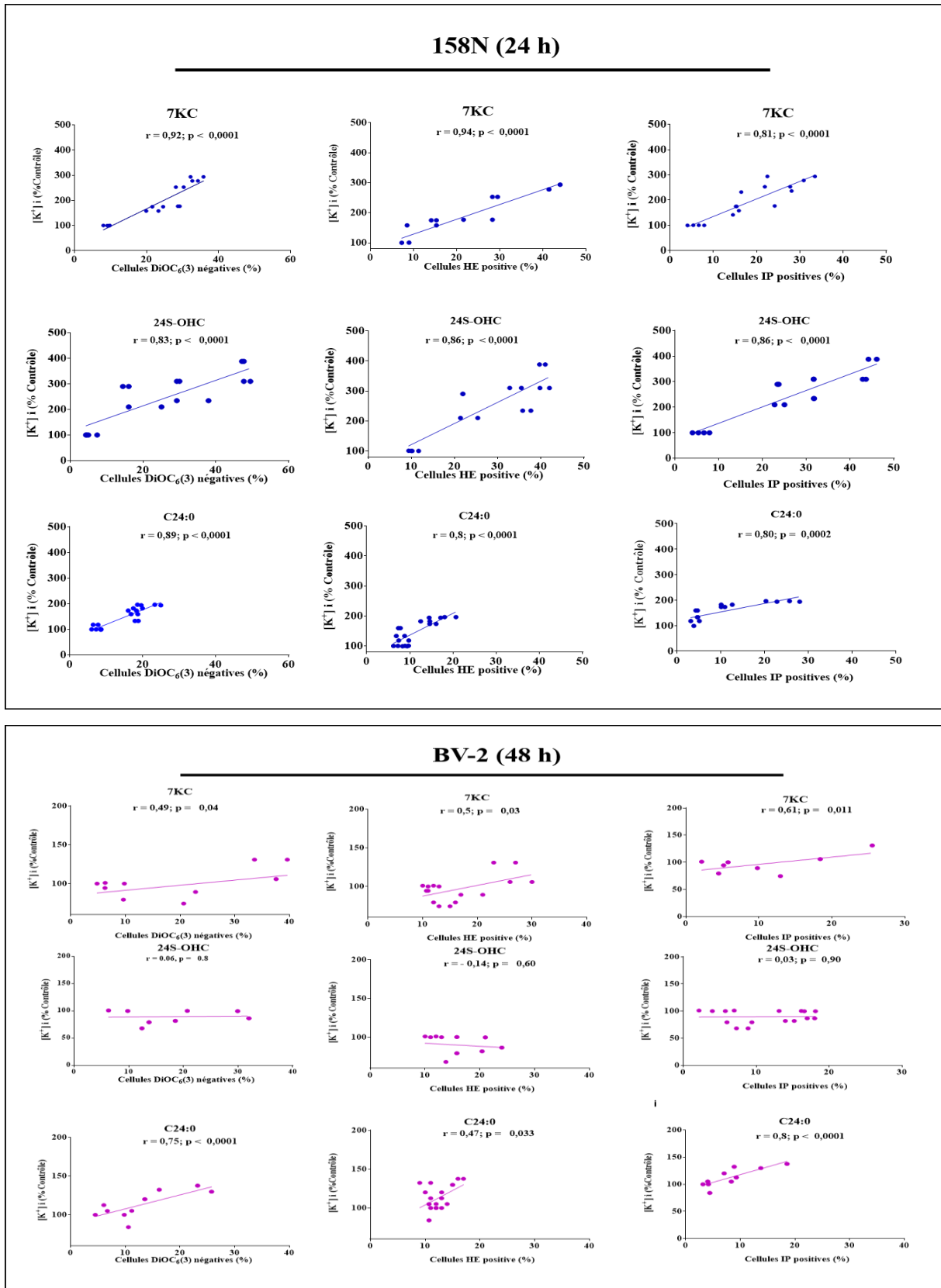


Figure 51 : Corrélation de Pearson entre la concentration intracellulaire du K⁺ ([K⁺]i) et le pourcentage de cellules DiOC6 (3) négatives, HE positives et IP positives

Les oligodendrocytes murins 158N et les cellules microgliales murines BV-2 ont été incubées en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M). Les variations de la $[K^+]_i$ ont été évaluées par photométrie de flamme. Les pourcentages des cellules DiOC₆(3) négatives, HE positives et IP positives sont déterminés par cytométrie en flux. Les corrélations ont été calculées avec le test de corrélation de Pearson.

1.6. Effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur la structure de la membrane plasmique

Le pouvoir cytotoxique des oxystérols et des AGTL est bien établi. Néanmoins, les voies conduisant à ces événements sont encore peu connues. Comme, il a été montré que les oxystérols s'incorporent dans la membrane cellulaire, leur insertion pourrait déformer l'agencement des constituants de la membrane et de leurs interactions fonctionnelles. Ceci nous a mené à supposer que l'accumulation intracellulaire du K^+ peut résulter d'une altération des structures membranaires impliquées dans la régulation de l'homéostasie potassique.

Pour évaluer cette hypothèse, nous avons cherché à déterminer si le 7KC, le 24S-OHC et le C24:0 sont capables de modifier l'arrangement lipidique de la membrane plasmique. Les cellules 158N sont cultivées pendant (1-24 h) en absence ou en présence du (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M). L'impact de ces derniers sur l'arrangement des phospholipides membranaires a été étudié par coloration des cellules à la merocyanine 540 (MC 540). Ce fluorochrome hydrophobique agit en détectant une diminution de l'ordre d'assemblage des phospholipides dans le feuillet externe de la bicouche lipidique de la membrane plasmique (Langner *et al.*, 1993 ; Harrison *et al.*, 2000). Les résultats sont présentés sous la forme du rapport (R) (MC 540 positives / MC 540 négatives).

L'application du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M) induit une augmentation marquée et dose dépendante de la valeur du R, ce qui signifie que l'ordre d'assemblage des phospholipides dans le feuillet externe de la bicouche lipidique de la membrane plasmique est réduit d'une manière dose dépendante. Ces effets sont intensifiés pour des périodes d'incubation plus importantes. En effet, 7KC (25 μ M), 24S-OHC (12,5 et 25 μ M) et C24:0 (10 et 20 μ M) modifient l'organisation lipidique de la membrane cytoplasmique à partir de 14 h d'incubation. Les effets de C24:0 sont moins néfastes que ceux du 7KC et du 24S-OHC. Après 24 h d'incubation, la désorganisation de la membrane cytoplasmique est significative à partir de la concentration 2,5 μ M pour 24S-OHC et 5 μ M pour C24:0 (**Figure 52**).

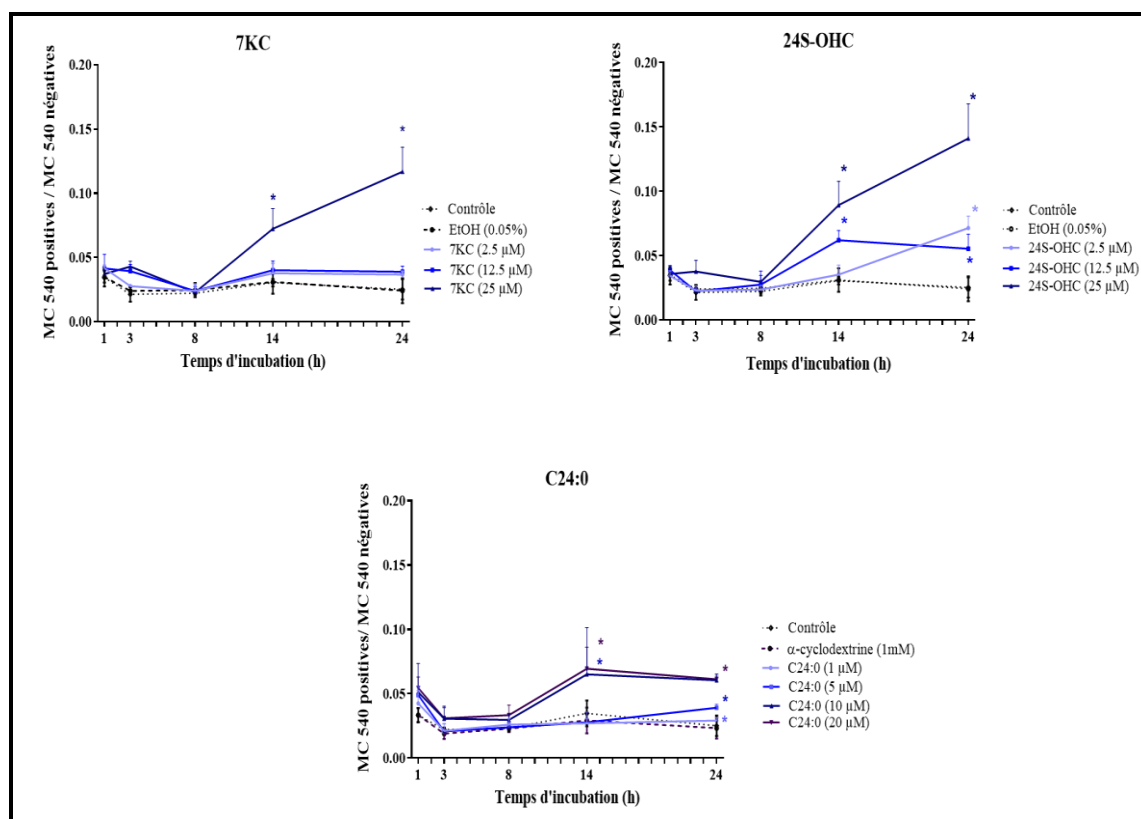


Figure 52 : Effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur l'organisation des lipides membranaires.

Les oligodendrocytes murins 158N ont été traitées pendant 1, 3, 8, 14 et 24 h en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M). L'arrangement des lipides membranaires a été estimé en utilisant la sonde MC 540. Les résultats présentés correspondent au [rapport [MC 540 positives / MC 540 négatives] sont présentés en moyenne \pm SD; ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate. Les significativités entre les cellules non traitées (contrôles), traitées par les véhicules (EtOH et l' α -cyclodextrine) ou par 7KC, 24S-OHC ou C24:0 sont calculées par le test Anova (Tukey's multiple comparisons); * $p < 0,05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0 / véhicule.

1.7. Evaluation du potentiel de la membrane plasmique sous l'effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0

Comme les changements de concentrations des ions extra- et intra-cellulaires peuvent influencer le potentiel de la membrane, nous avons voulu savoir si l'accumulation du K^+ induite par 7KC, 24S-OHC et C24:0 pouvait modifier ce potentiel. Pour cela, nous avons utilisé une sonde spécifique pour la mesure du potentiel membranaire utilisable en cytométrie

en flux, le DiBAC2(3). Le DiBAC2(3), ou Bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid) triméthine oxonol, est une sonde anionique dérivée de l'oxonol, dont la fluorescence augmente au fur et à mesure de la dépolarisation membranaire.

L'étude du potentiel membranaire par la sonde DiBAC2(3) prouve que l'exposition des oligodendrocytes 158N au 7KC (25 μM), 24S-OHC (25 μM) dépolarise la membrane cytoplasmique dès 3 h d'incubation. Au bout de 14 h de traitement par le 7KC (25 μM), la dépolarisation membranaire atteint un plateau ; avec le 24S-OHC (25 μM) la dépolarisation continue d'augmenter (**Figure 53**). Aucune différence significative du potentiel membranaire n'a été observée avec 24S-OHC (2,5 et 12,5 μM), 7KC (2,5 μM) avant 14 h d'incubation (**Figure 53**). Le C24:0, quant à lui, n'induit qu'une légère dépolarisation membranaire significative, observée après 24 h de traitement dès 5 μM (**Figure 53**).

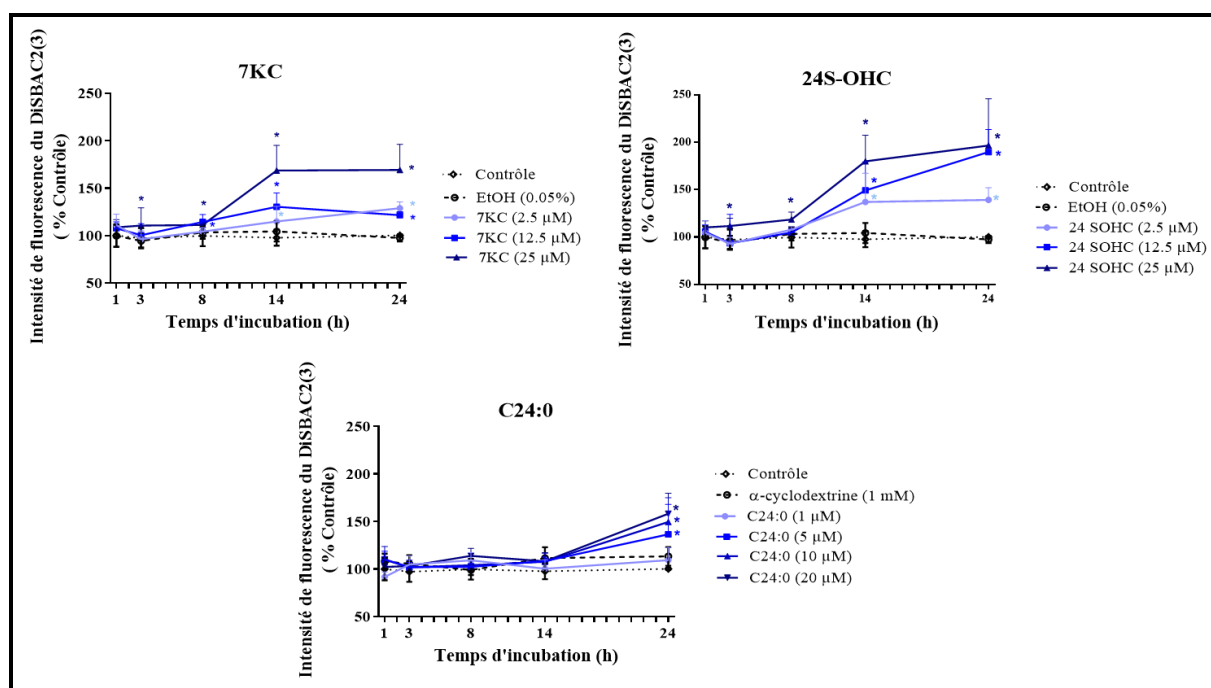


Figure 53 : Effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur le potentiel de la membrane plasmique.

Les oligodendrocytes murins 158N ont été traitées pendant 1, 3, 8, 14 et 24 h en présence de 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μM) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM). Le potentiel de la membrane plasmique a été estimé en utilisant la sonde DiBAC2(3). Les résultats représentés en moyenne \pm SD correspondent à [intensité du fluorescence de chaque essai rapportée au nombre de cellules / intensité du fluorescence du contrôle rapportée au nombre de cellules] ; ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate. Les significativités entre les cellules non traitées (contrôle), traitées par les véhicules (EtOH et α -cyclodextrine) ou par 7KC, 24S-OHC ou C24:0 sont calculées

par le test Anova (Tukey's multiple comparisons); * $p < 0,05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0 / véhicule.

1.8. Incidence de la concentration intracellulaire de potassium sur la cytotoxicité induite par le 7KC, 24S-OHC et C24

En se référant au fait que le K^+ joue un rôle prépondérant dans l'induction de la mort cellulaire en réponse à de nombreux agents cytotoxiques, le 7KC, 24S-OHC et C24:0 pourraient être des bloqueurs des canaux K^+ ce qui favoriserait la rétention intracellulaire du K^+ . Ces observations nous ont amené à déterminer si l'accumulation de K^+ peut intensifier l'induction de la mort cellulaire induite par le 7KC, 24S-OHC et C24:0. Pour aborder cette hypothèse, nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'implication des Kv sachant que leur ouverture et fermeture dépend du potentiel membranaire. Ainsi, les oligodendrocytes murins 158N ont été prétraitées pendant 1 h avec la 4-AP (2 mM) associées ou non pendant 24 h aux 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1; 5; 10 et 20 μ M). La viabilité cellulaire a été évaluée par microscopie en contraste de phase et par cytométrie en flux en prenant en compte le potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) mesuré par coloration au DiOC₆(3), la perte de l'intégrité de la membrane cytoplasmique et la fragmentation de l'ADN internucléosomique (évaluée par l'apparition d'un pic SubG1), par analyse de la morphologie des noyaux par microscopie à fluorescence et par le clivage de la caspase-3 et de PARP (Poly(ADP-ribose) Polymérisé) évalué par western blot.

La microscopie en contraste de phase montre que le prétraitement avec 4-AP (2 mM) réduit la viabilité et la prolifération des cellules traitées par 7KC, 24S-OHC et C24:0. Une augmentation dose dépendante du nombre des cellules rondes associée à une diminution du nombre des cellules adhérents (considérées comme vivantes) est observée. La morphologie des cellules contrôles, des cellules traitées avec les véhicules et par la 4-AP ne présente pas des changements marqués, seules des cellules adhérentes sont détectées (**Figure 54**).

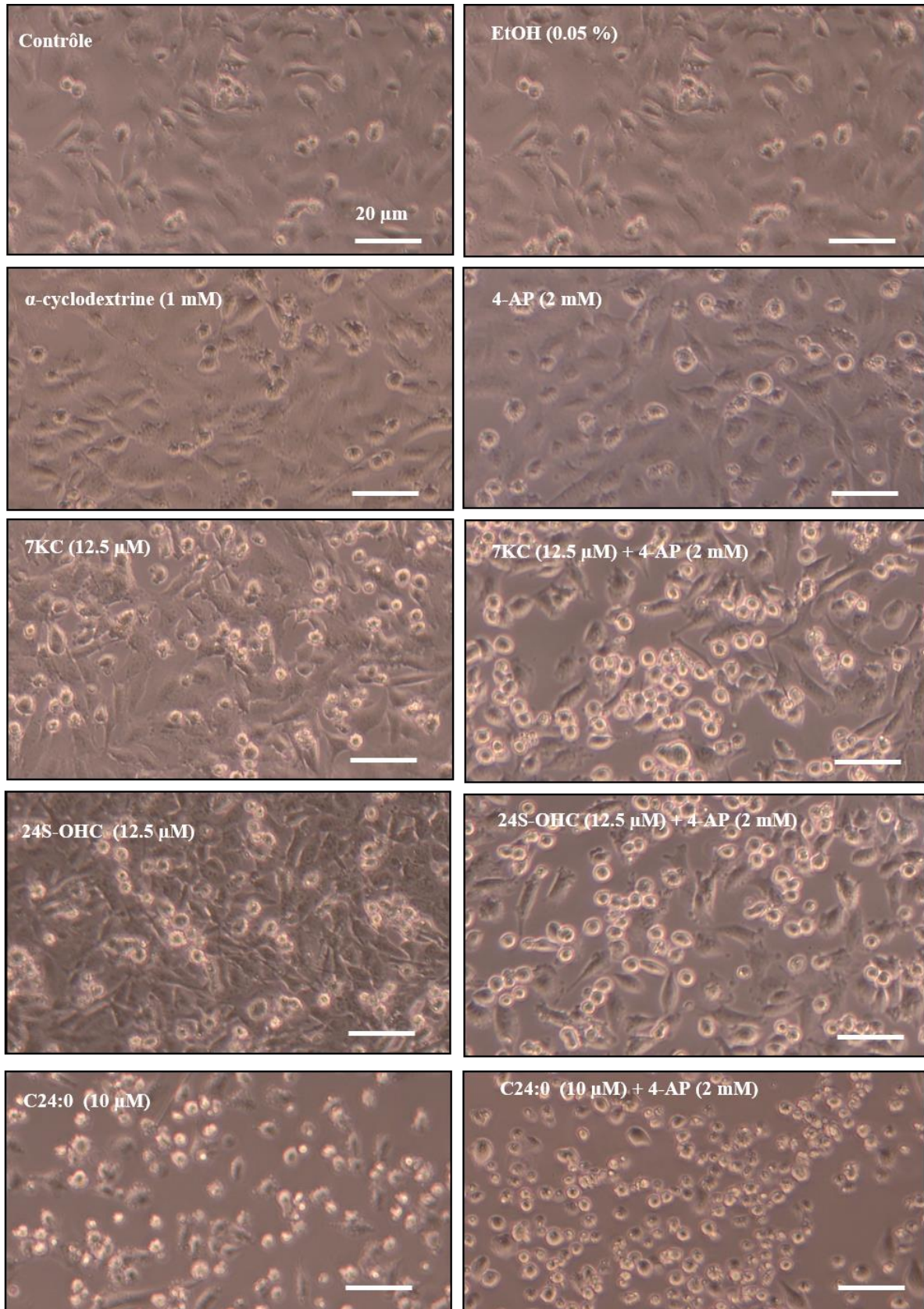


Figure 54 : Exacerbation par la 4-AP des changements morphologiques et de perte d'adhésion cellulaire induites par le 7KC, 24S-OHC et C24: 0.

Les cellules 158N ont été incubées pendant 24 h avec du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M) en absence et en présence) de la 4-AP (2mM) (1 h de prétraitement). L'observation des cellules 158N a été réalisée par microscopie en contraste de phase.

L'analyse par cytométrie en flux montre que la diminution du nombre de cellules adhérentes et vivantes, observées par microscopie en contraste de phase, est associée à une diminution dose-dépendante du $\Delta\Psi_m$ et à une augmentation de la perméabilité à l'IP comparativement à ceux de 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M) et à celle du 4-AP (2 mM). En effet, le prétraitement des cellules 158N par la 4-AP (2 mM) favorise la chute du $\Delta\Psi_m$ et la perte de l'intégrité membranaire dès 2,5 μ M pour 7KC et 24S-OHC. Le C24:0 diminue le $\Delta\Psi_m$ dès 5 μ M et induit l'augmentation de la perméabilité à l'IP dès 10 μ M. Après association avec la 4-AP, la diminution de $\Delta\Psi_m$ et l'augmentation de la perméabilité à l'IP sont plus marquées. La 4-AP (2 mM) augmente le pourcentage des cellules avec mitochondries dépolarisées à partir de 2,5 μ M de 7KC et 24S-OHC et de 1 μ M de C24:0. Cette dépolarisation mitochondriale est associée à une augmentation du pourcentage des cellules IP positives pour 7KC et C24:0. Pour le 24S-OHC, la dépolarisation de la mitochondrie n'a pas abouti à une modification du pourcentage des cellules IP positives sous l'action de la 4-AP. Ceci peut être expliqué par la capacité du 24S-OHC à induire une désorganisation des phospholipides membranaires, une dépolarisation de la membrane cytoplasmique et une accumulation du potassium plus importante que celles observées en présence du 7KC et du C24:0. Les effets les plus marqués sont observés suite aux associations de la 4-AP avec le C24:0.

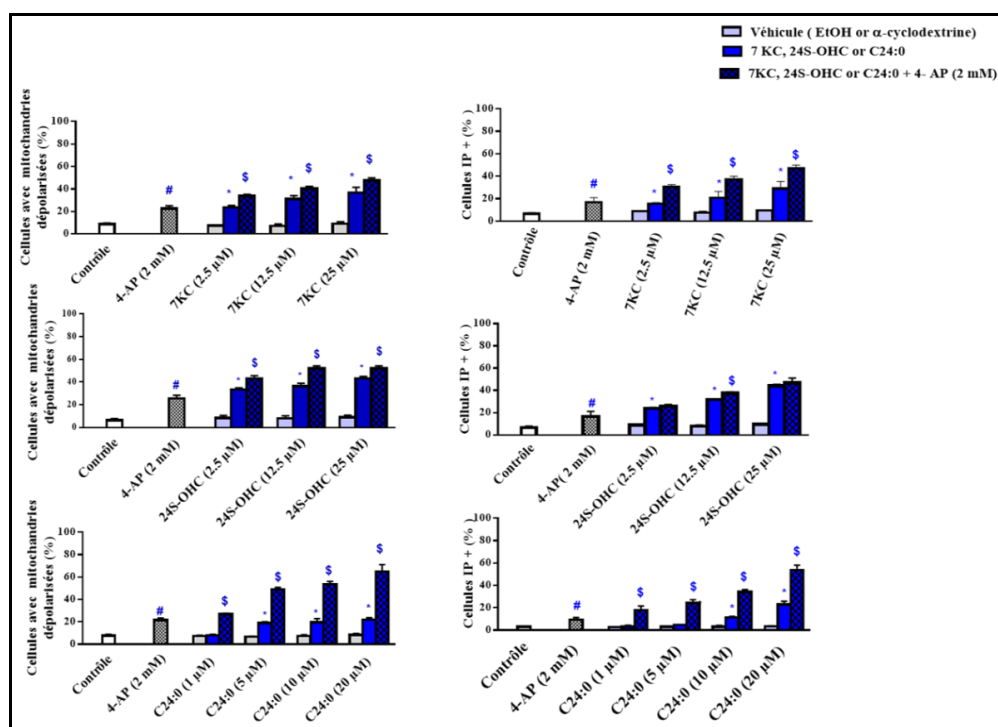


Figure 55 : Evaluation de l'effet de l'inactivation des canaux voltage dépendant par la 4-AP sur le potentiel transmembranaire mitochondrial et sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique.

Les cellules 158N ont été incubées pendant 24 h en absence ou en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μM) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM) en absence et en présence) de la 4-AP (2 mM) (1 h de prétraitement). Les pourcentages des cellules avec des mitochondries dépolarisées et perméables à l'IP sont déterminés par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SD, ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate. La significativité entre le véhicule (EtOH et α -cyclodextrine) et les cellules traitées avec 7KC, 24S-OHC ou C24:0 est calculée par le test Anova (Tukey's multiple comparisons); * $p < 0,05$, 7KC, 24S-OHC ou C24:0 / véhicule.

En se référant aux résultats antérieurs établis par notre équipe mettant en évidence que le 7KC et le 24S-OHC induisent un mode particulier de mort cellulaire impliquant simultanément l'oxydation, l'apoptose et l'autophagie, nommé oxiapoptophagie (Nury *et al.*, 2014), nous avons cherché à déterminer les conséquences de l'inactivation des Kv sur l'induction de l'apoptose en présence du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sachant que le C24:0 induit une mort cellulaire non-apoptotique. Ainsi, nous avons analysé la morphologie nucléaire (noyaux condensés et /ou fragmentés) par microscopie à fluorescence après coloration des noyaux cellulaires par le Hoechst 33342 et la fragmentation de l'ADN par analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux (présence d'un pic SubG1).

L'analyse des images des noyaux de cellules 158N prétraitées, pendant 1 h, par la 4-AP (2 mM) puis traitées, pendant 24 h en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M) induit une augmentation statistiquement significative du pourcentage de cellules présentant une condensation et/ou une fragmentation du noyau (caractéristiques des cellules apoptotiques) ainsi que du pourcentage de cellules en Sub-G1 (cellules avec de l'ADN fragmenté de façon internucléosomale) comparativement aux pourcentages observés en présence de 7KC (25 μ M), 24S-OHC (12,5; 25 μ M). Le faible pourcentage de cellules apoptotiques induits par C24:0 a été significativement augmenté par la 4-AP tout en étant faible (de l'ordre de 8%).

Les images des noyaux de cellules traitées avec les véhicules (éthanol (0,005-0,05%)) ou α -cyclodextrine (0,05-1 mM) ou la 4-AP (2 mM) ne montrent aucune modification comparativement aux cellules contrôles. Les noyaux gardent leur forme ronde et ne présentent ni marginalisation de la chromatine, ni condensation, ni fragmentation (**Figure 56**).

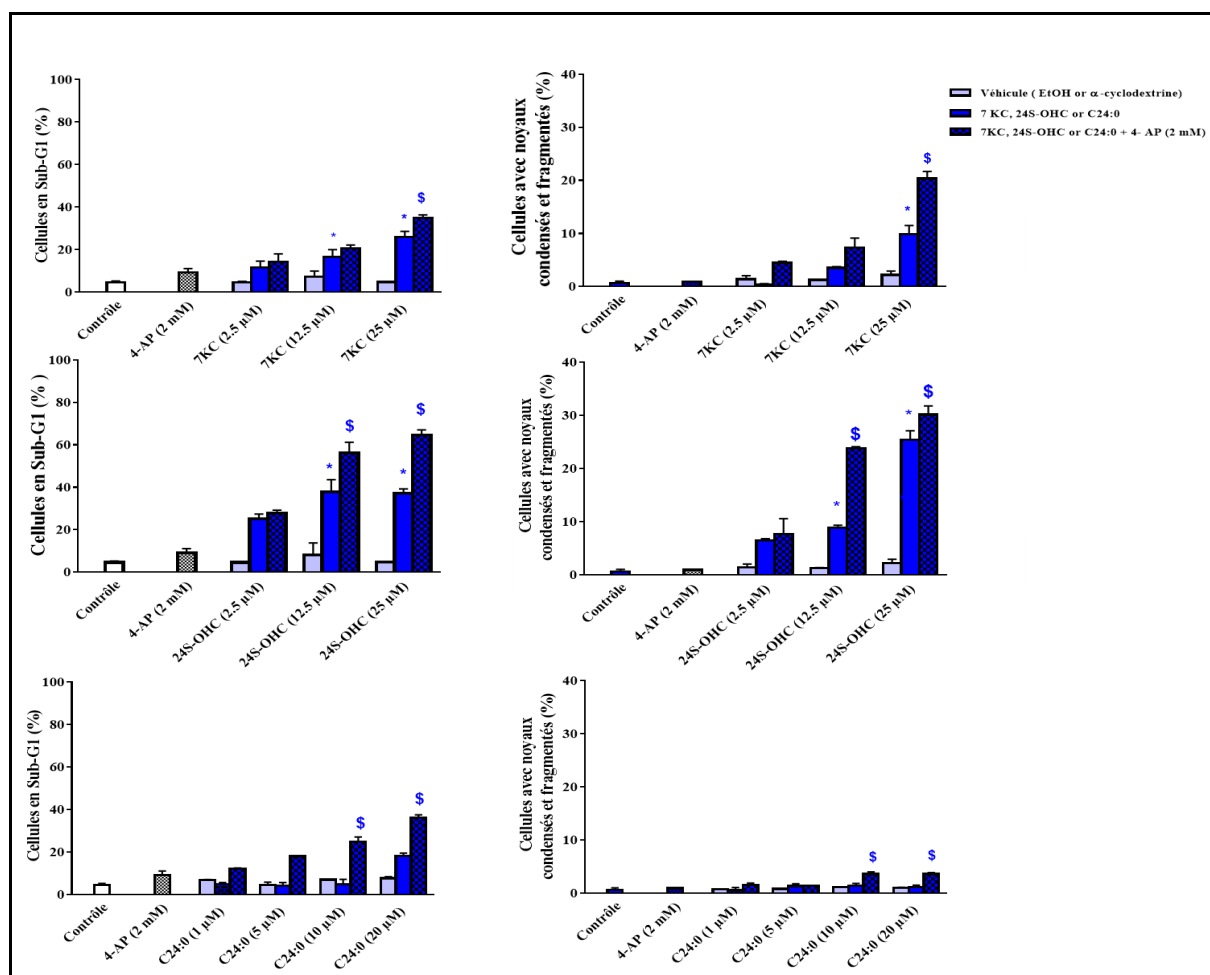


Figure 56 : Analyse de l'effet de l'inactivation des canaux voltage dépendant sur de la mort cellulaire induite par 7KC, 24S-OHC et C24:0.

*Les cellules 158N ont été incubées pendant 24 h en absence ou en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M) en absence et en présence) de la 4-AP (2 mM) (1 h de prétraitement). La morphologie des noyaux a été analysée par microscopie à fluorescence après coloration des noyaux par le Hoechst 33342. Le pourcentage de cellules en sub-G1 a été analysé par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SD; ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate. La significativité entre le véhicule (EtOH et l' α -cyclodextrine) et les cellules traitées avec 7KC, 24S-OHC ou C24:0 est calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); * $p < 0,05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0 / véhicule.*

De même, l'association du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) avec la 4-AP (2 mM) active le clivage de la pro-caspase-3 et de PARP. En effet, l'intensité des bandes présentant la forme active de la caspase-3 et la forme clivée de PARP augmente lorsque les cellules sont prétraitées avec la 4-AP (**Figure 57**).

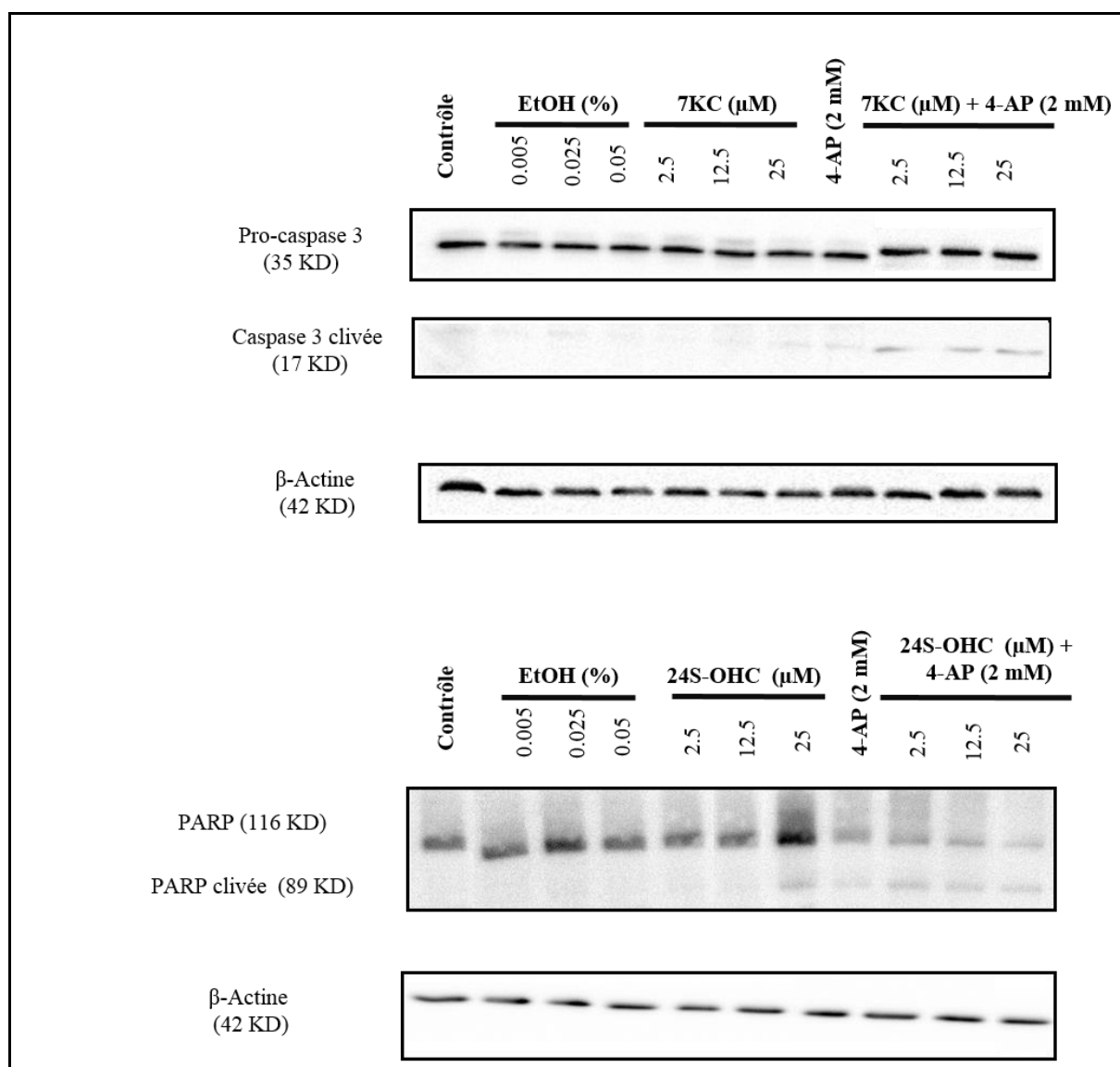


Figure 57 : Amplification par la 4-AP du clivage de pro-caspase 3 et de PARP induit par le 7KC et le 24S-OHC.

Les cellules 158N ont été incubées pendant 24 h avec du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M) en absence et en présence de la 4-AP (2 mM) (1 h de prétraitement). L'apoptose est caractérisée par western blotting. L'apoptose a été évaluée par le clivage de la pro-caspase-3 (bande à 17 kDa) et de PARP (bande à 89 kDa).

Dans l'ensemble, nos données supportent l'hypothèse selon laquelle l'inhibition des canaux Kv conduit à une augmentation de la $[K^+]_i$ et contribue à la cytotoxicité du 7KC, 24S-OHC et C24:0.

2. Implication de Kv3.1 dans la lipotoxicité microgliale et oligodendrocytaire du 7KC, 24S-OHC et C24:0

Comme la cytotoxicité du 7KC, 24S-OHC et C24:0 implique les Kv, nous avons sélectionné le canal Kv3.1 caractérisé par un seuil d'activation très élevé fortement dépendant de la dépolarisation membranaire pour mieux illustrer l'impact de ces composés. Par western blot et immunomarquage, nous avons d'abord défini l'expression de Kv3.1 sur nos modèles cellulaires. Par la suite, par les mêmes techniques, nous avons évalué la capacité de dérivés oxydés de cholestérol (7KC et 24S-OHC) et de l'acide gras à très longue chaîne (C24:0) à moduler le niveau d'expression de Kv3.1b.

2.1. Evaluation de l'expression de Kv3.1 dans les oligodendrocytes murins 158N et les cellules microgliales BV-2

L'expression de Kv3.1 par les cellules 158N et BV-2 a été évaluée par immunofluorescence quantifiée par cytométrie en flux, par microscopie à fluorescence conventionnelle et par western blot. Les différentes techniques utilisées montrent que les 158N et les BV-2 expriment Kv3.1.

L'expression de la protéine Kv3.1 (Kv3.1a et / ou Kv3.1b) a été étudiée en utilisant soit un anticorps monoclonal de souris reconnaissant la séquence des acides aminés 118-179 (Santa Cruz détectant à la fois les deux isoformes de Kv3.1), un deuxième anticorps polyclonal de lapin (Abcam de spécificité inconnue) et un troisième anticorps monoclonal de souris reconnaissant l'extrémité C (437-585) spécifique à Kv3.1b (Sigma-Aldrich). Un niveau élevé d'expression de Kv3.1 a été observé dans les cellules 158N et BV-2. Le pourcentage de cellules Kv3.1 positives variait de 90 à 98%, et l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) était plus forte que celle du conjugué (**Figure 58 A**). Cette forte expression de Kv3.1 a été confirmée par microscopie à fluorescence (**Figure 58 B**). Ces observations indiquent que Kv3.1 est fortement exprimé par les cellules 158N et BV-2.

L'analyse de l'expression du Kv3.1 par western blot n'a été évaluée qu'avec l'anticorps anti Kv3.1b (Sigma-Aldrich). L'analyse de l'expression de cette protéine avec les deux autres anticorps n'a pas été poursuivie du fait que l'anticorps Santa-Cruz n'a pas donné de résultats satisfaisants en western blot et que la spécificité de l'anticorps Abcam n'était pas fournie. Les western blots obtenus avec Sigma-Aldrich (**Figure 58 C**) ont révélé une seule bande d'environ 66 kDa, correspondant au cœur de Kv3.1b (**Ozaita et al., 2002**). Les cellules 158N et BV-2 expriment donc Kv3.1b.

L'anticorps Sigma-Aldrich a été retenu pour caractériser les effets de 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur le niveau d'expression de Kv3.1b.

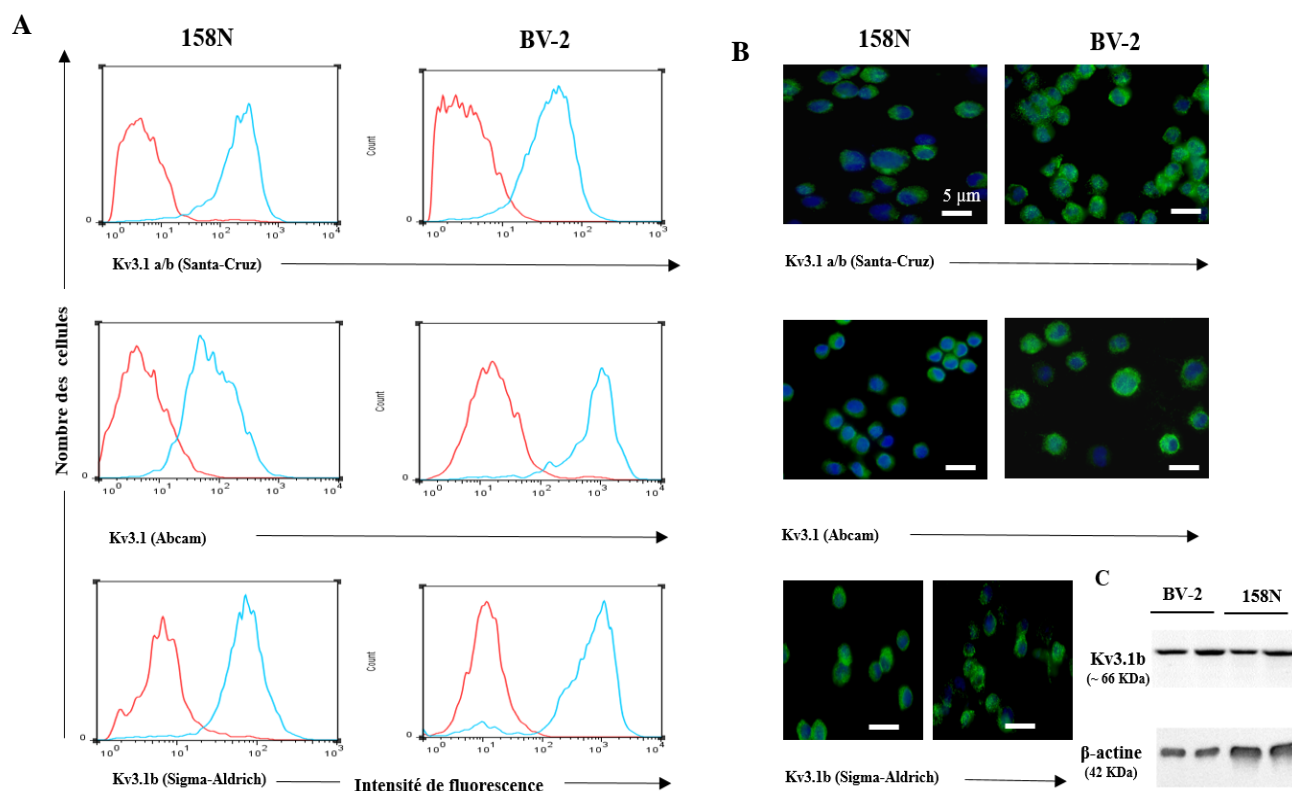


Figure 58 : Evaluation de l'expression de Kv3.1 par les oligodendrocytes murins 158N et par les cellules microgliales murines BV-2 par cytométrie en flux, microscopie à fluorescence et western blot

Les cellules ont été cultivées pendant 48 h puis l'expression de Kv3.1 a été évaluée par immunofluorescence (cytométrie en flux, microscopie conventionnelle à fluorescence) et par western blot. A : analyse de l'expression de Kv3.1 par cytométrie en flux en utilisant différents anticorps anti-Kv3.1. B : observation des cellules en microscopie conventionnelle à fluorescence réalisée après superposition de l'immunomarquage des cellules par les anticorps anti Kv3.1 et une contre coloration des noyaux au Hoechst 33342 ; C : révélation de l'expression de Kv3.1b par western blot réalisée par l'anticorps monoclonal spécifique de la région C terminale (437-585) de Kv3.1.

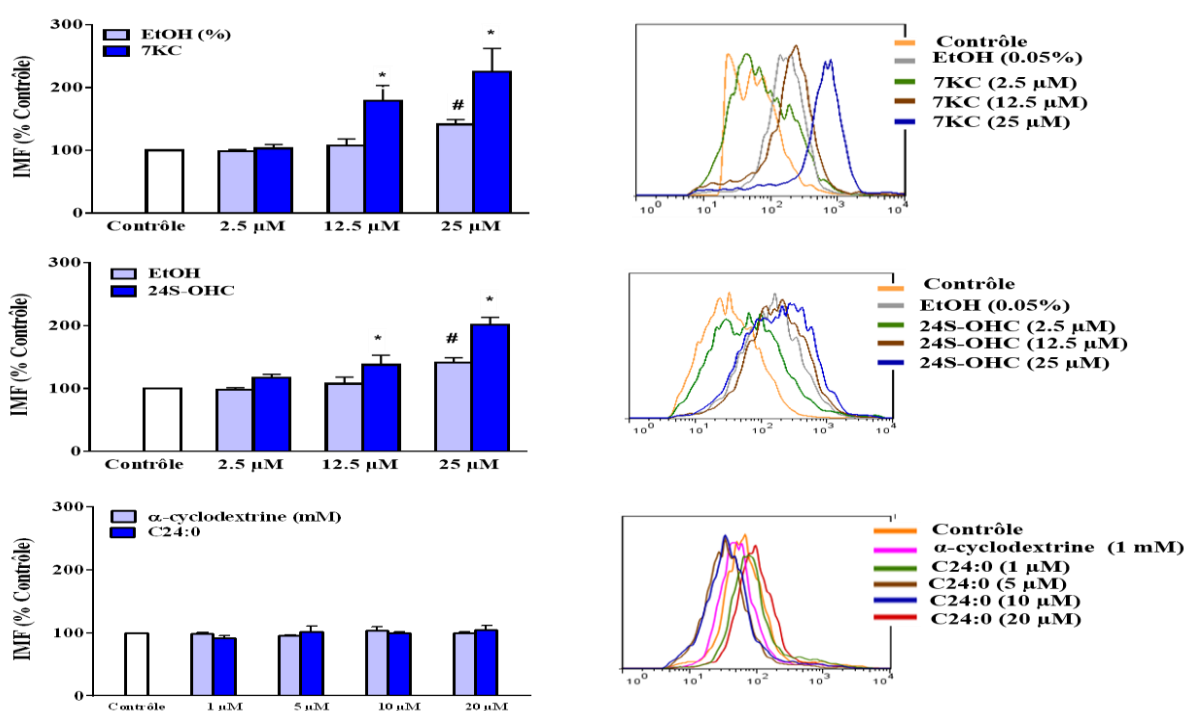
2.2. Effet de 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur l'expression de Kv3.1b

Pour évaluer l'impact de 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur l'expression de Kv3.1b, les cellules 158N et BV-2 ont été cultivées pendant 24 et / ou 48 h dans des plaques de 12 puits en absence ou en présence de 7KC (2,5 ; 12,5 et 25 μM), de 24S-OHC (2,5 ; 12,5 et 25 μM) ou

de C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM). L'analyse du niveau d'expression de Kv3.1b a été effectuée par cytométrie en flux et les données présentées montrent l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) de l'essai normalisée par rapport à celle du contrôle. Les blots représentant la modulation de l'expression de Kv3.1b sont présentés dans la **Figure 59 A**. Pour chaque essai, un western blot utilisant l'anticorps spécifique de la β -actine a été aussi réalisé afin de normaliser le niveau d'expression de Kv3.1b issue de chaque condition de traitements. Le niveau d'expression de Kv3.1b a été évalué selon la formule suivante : (Valeur normalisée de l'essai) / (valeur normalisée du contrôle).

L'analyse de l'expression de Kv3.1 par les cellules 158N montrant des niveaux d'expression plus marqués ont été observés avec 7KC (12,5 et 25 μM) et 24S-OHC (12,5 et 25 μM). Une légère augmentation a été observée en présence d'EtOH (0,05%). Par ailleurs, le traitement avec C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM) ne montre pas d'effet sur l'expression de Kv3.1b. Ces données sont en accord avec ceux obtenus par western blot qui ont aussi révélé une augmentation du niveau d'expression de Kv3.1b avec 7KC (2,5 μM) (**Figure 59 B**). Pour C24:0, aucune modification de l'expression de Kv3.1b n'a été détectée par cytométrie en flux ; aucune induction de l'expression de Kv3.1b a été observée avec l'éthanol (0,005 et 0,025%) ou avec l' α -cyclodextrine (0,05 ; 0,25 0,5 et 1 mM) comparativement au contrôle (**Figure 59 A-B**).

A



B

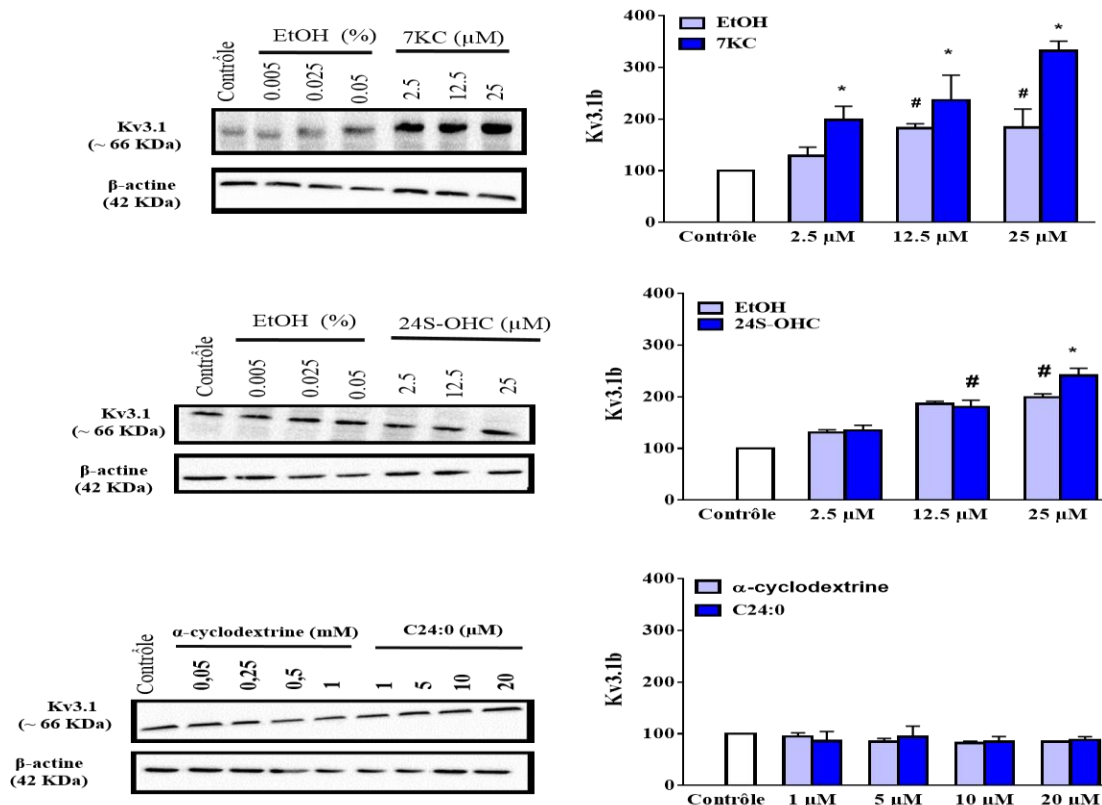


Figure 59 : Analyse des effets de 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur l'expression de Kv3.1b dans les oligodendrocytes murins 158N.

Les cellules 158N ont été incubées pendant 24 h en absence ou en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μM) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM). A : l'expression de Kv3.1 a été évaluée par cytométrie en flux en utilisant l'anticorps spécifique de la région C terminale (437-585) de Kv3.1b (Anticorps Sigma-Aldrich). B : le même anticorps a été utilisé pour les analyses par western blot. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SD; ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate. La significativité entre le véhicule (EtOH et α-cyclodextrine) et les cellules traitées avec 7KC, 24S-OHC ou C24:0 a été calculée par le test Anova (Sidak's multiple comparisons); # $P < 0.05$ véhicule / contrôle; * $p < 0,05$, 7KC, 24S-OHC ou C24:0 / véhicule.

Le traitement des cellules BV-2 dans les mêmes conditions que les 158N ne montre aucune modulation significative de l'expression de Kv3.1b (**Figure 60 A**). Une exposition prolongée de 48 h a été nécessaire pour induire une surexpression significative de Kv3.1b avec 7KC et 24S-OHC (25 μM) et avec C24:0 (10 μM) (**Figure 60 B**). Aucune différence n'a été observée

entre le contrôle et les véhicules (éthanol (0,005 ; 0,025 et 0,05 %) ou α - cyclodextrine (0,05 ; 0,25 0,5 et 1 mM) (Figure 60).

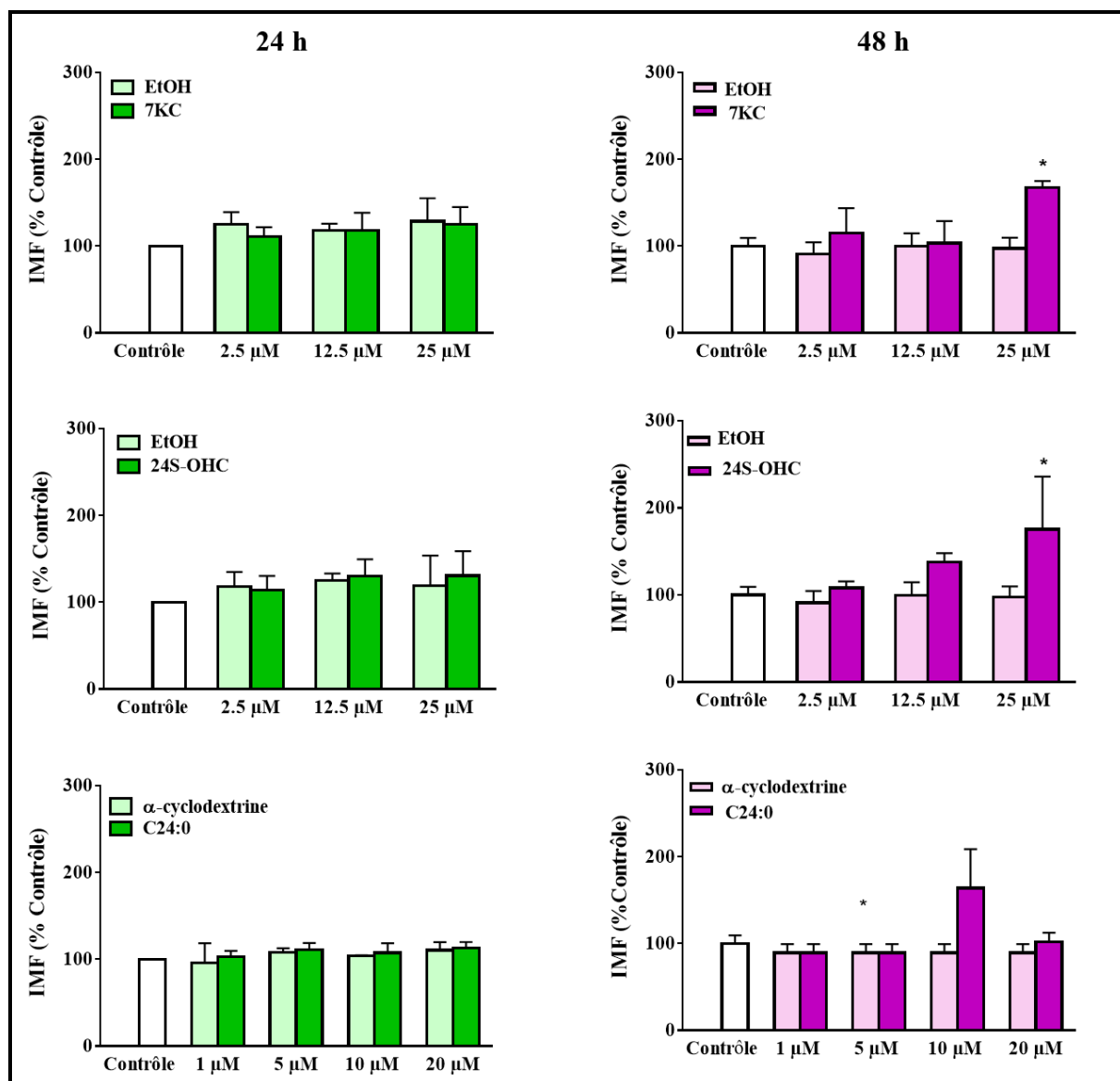


Figure 60 : Analyse des effets de 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur l'expression de Kv3.1b sur les cellules microgliales murines BV-2.

Les cellules BV-2 ont été incubées pendant 24 h en absence ou en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M). L'expression de Kv3.1b a été évaluée par cytométrie en flux par immunomarquage en utilisant l'anticorps spécifique de la région C terminale (437-585) de Kv3.1b (Anticorps Sigma-Aldrich). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SD; ils ont été obtenus à partir d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate. La significativité entre le véhicule (EtOH et α -cyclodextrine) et les cellules traitées avec 7KC, 24S-OHC ou C24:0 a été calculée par le

test Anova (Sidak's multiple comparisons); # $P < 0.05$ véhicule / contrôles; * $p < 0,05$, 7KC, 24S-OHC ou C24:0 / véhicule.

2.3. Corrélation entre expression de Kv3.1b et concentration intracellulaire de potassium

Afin de définir une éventuelle relation entre le niveau d'expression de Kv3.1b évalué par cytométrie en flux, présenté dans les **Figures 59 et 60**, et la $[K^+]_i$ mesurée par photométrie en flamme, présenté dans la **Figure 50**, nous avons étudié la corrélation de ses deux paramètres sur les cellules 158N et BV-2 traitées par des concentrations croissantes de 7KC, 24S-OHC et C24:0, pendant 24 et / ou 48 h.

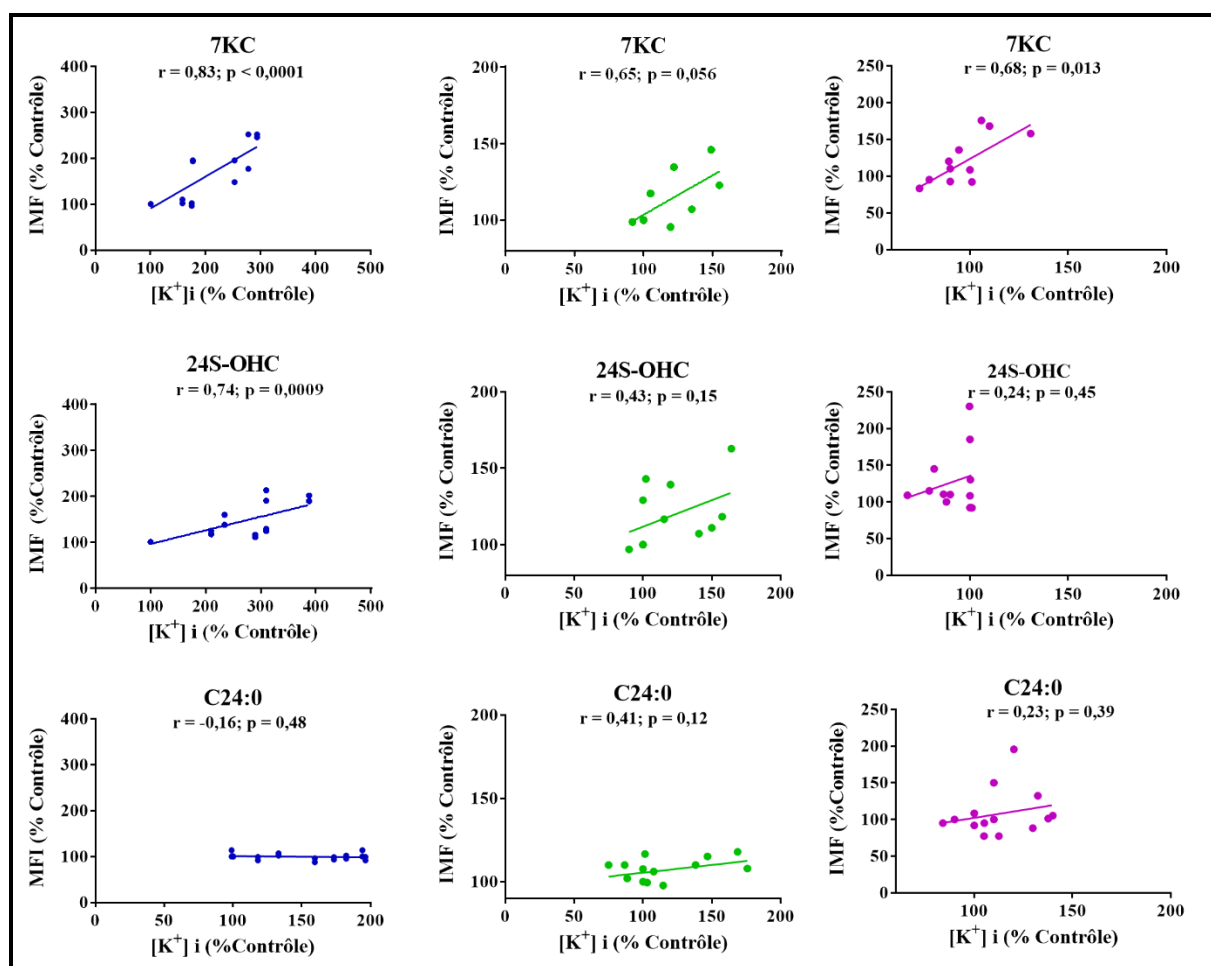


Figure 61 : Corrélation de Pearson entre expression de Kv3.1b et concentration intracellulaire de K^+ ($[K^+]_i$).

Les oligodendrocytes murins 158N et les cellules microgliales murines BV-2 ont été incubées en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μM) ou C24:0 (1, 5, 10 et

20 μM). Les variations de la $[\text{K}^+]_i$ ont été évaluées par photométrie de flamme. L'expression de *Kv3.1b* a été évaluée par cytométrie en flux. Les corrélations ont été calculées avec le test de corrélation de Pearson.

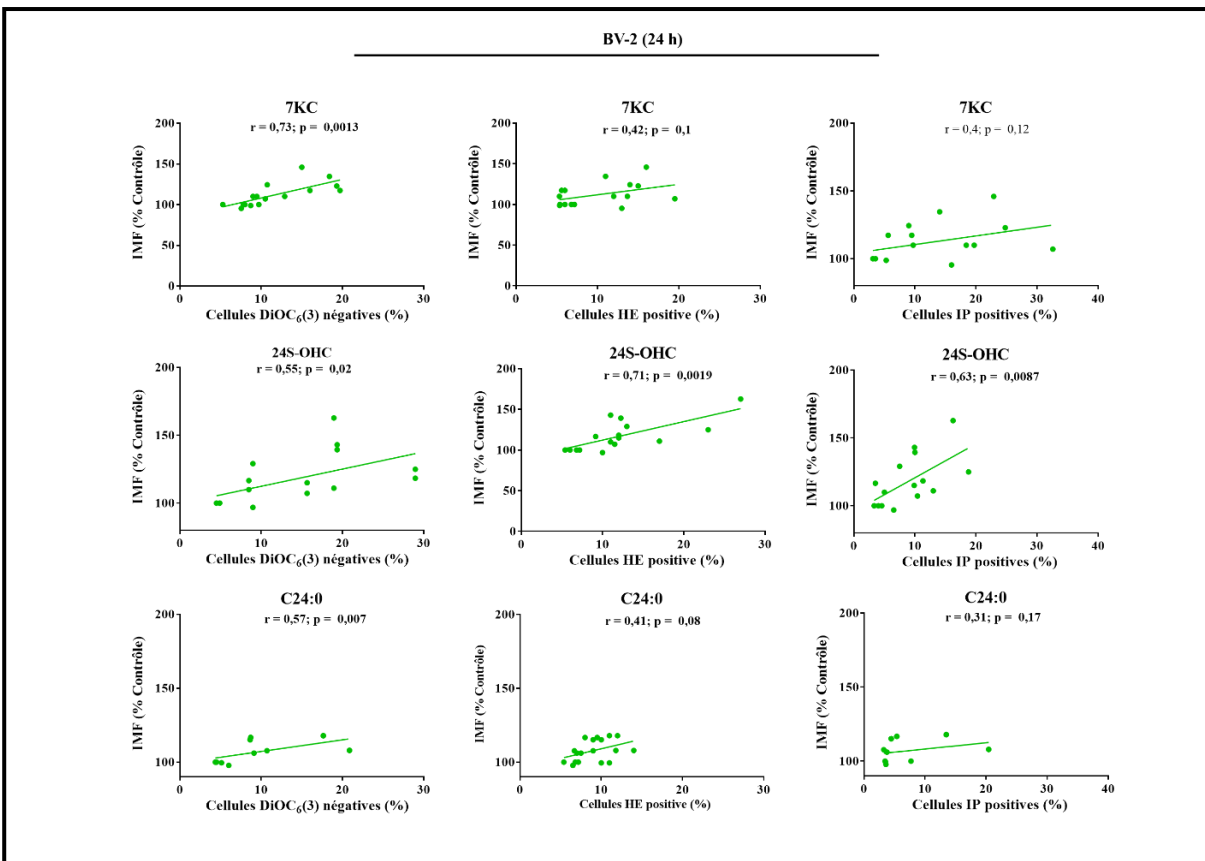
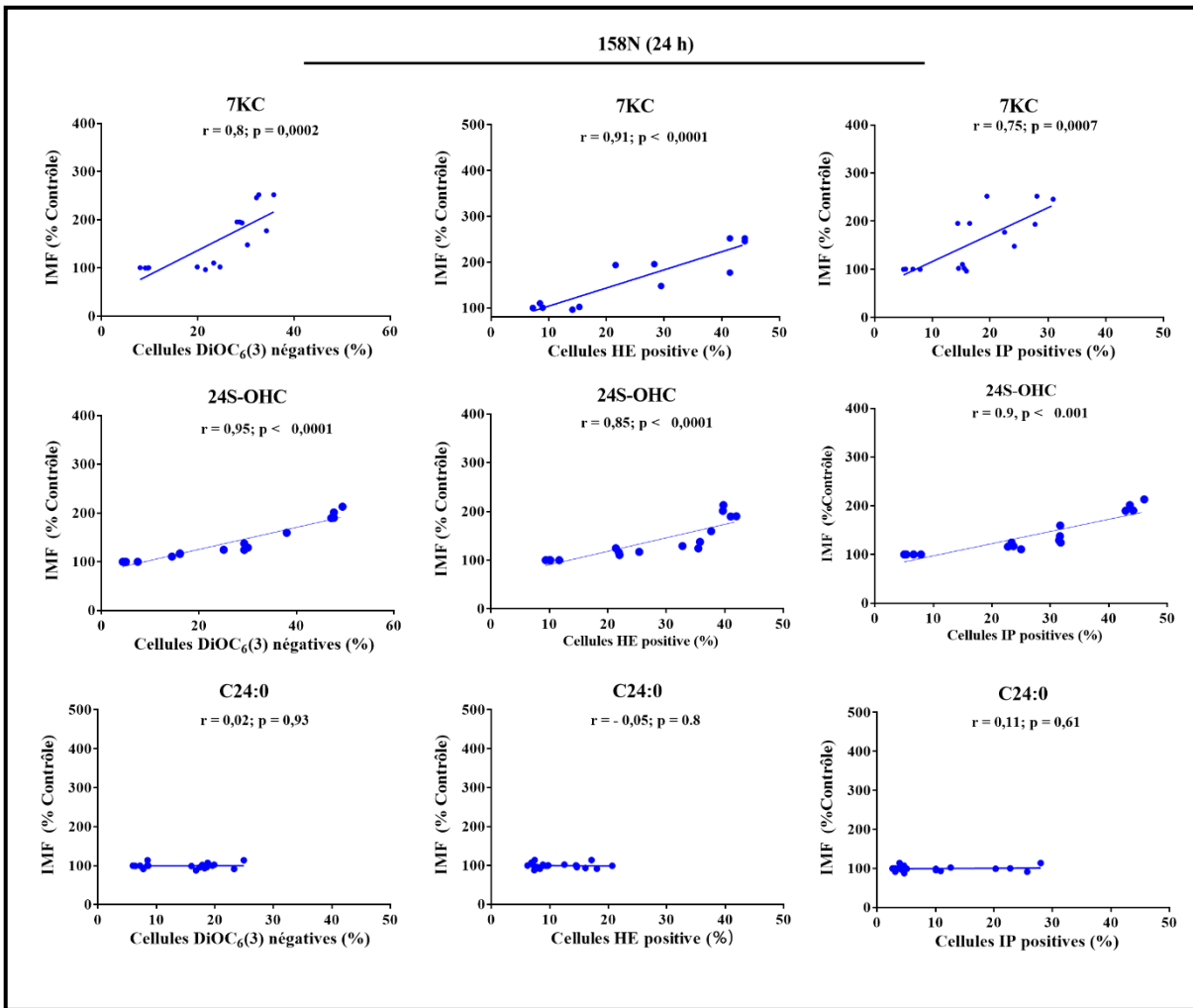
Une forte corrélation positive est observée en présence du 7KC après traitement des 158N pendant 24 h ($r = 0,83$; $p < 0,0001$) et des BV-2 pendant 24 h ($r = 0,65$; $p = 0,056$) et 48 h ($r = 0,68$; $p < 0,013$) (**Figure 61**).

En présence de 24S-OHC, l'augmentation de l'expression de *Kv3.1b* observée sur les 158N est également corrélée avec la $[\text{K}^+]_i$ ($r = 0,74$; $p = 0,0009$). Pour les BV-2, bien que la $[\text{K}^+]_i$ soit significativement élevée après 24 h et que l'expression de *Kv3.1b* soit induite après 48 h, ses deux paramètres n'étaient pas significativement corrélés (**Figure 61**).

Aucune corrélation n'a été observée avec C24:0 (**Figure 61**). Ces données suggèrent donc que l'augmentation de la $[\text{K}^+]_i$ mesurée suite au traitement des 158N et BV-2 par le C24:0 est indépendante du niveau d'expression de *Kv3.1b* (**Figure 61**).

2.4. Corrélation entre expression de *Kv3.1b*, stress oxydant et mort cellulaire

Pour déterminer si la modulation de l'expression de *Kv3.1b* en présence de 7KC, 24S-OHC et C24:0 peut être reliée à la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial, la surproduction de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et la perméabilité à l'iodure de propidium, nous avons analysé la corrélation entre et le taux d'expression de *Kv3.1b* et le pourcentage de cellules DiOC₆(3) négatives (cellules avec mitochondries dépolarisées), HE positives (cellules surproduisant $\text{O}_2^{\bullet-}$) et IP positives (cellules avec des membranes altérées considérées comme des cellules mortes) sur les cellules 158N et BV-2 traitées, pendant 24 et / ou 48 h, en absence ou en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μM), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μM) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μM).



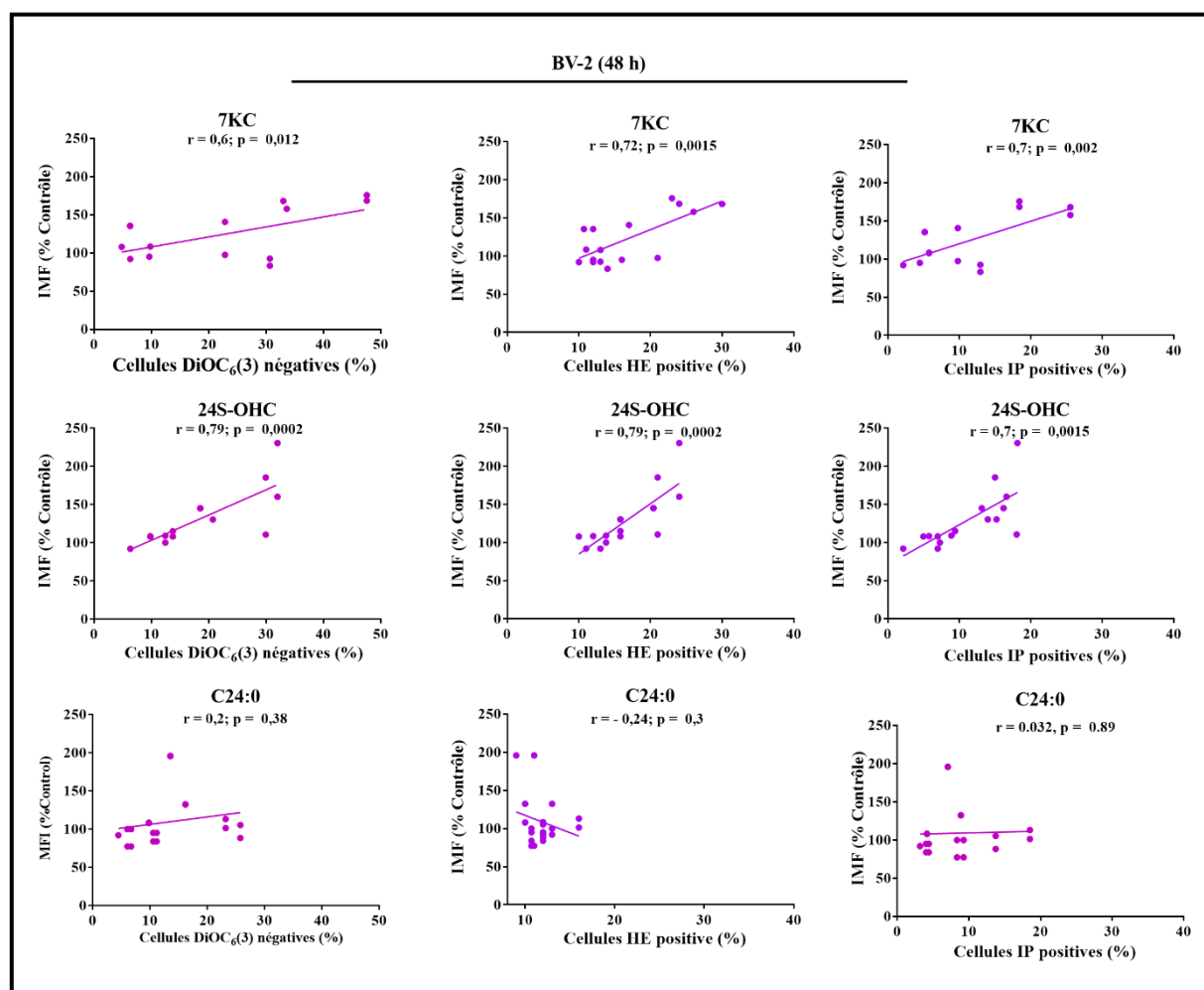


Figure 62 : Correlation de Pearson entre expression de Kv3.1b et pourcentage de cellules DiOC₆(3) négatives, HE positives et IP positives.

Les oligodendrocytes murins 158N et les cellules microgliales murines BV-2 ont été incubées en présence du 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M). L'expression de Kv3.1b a été évaluée par cytométrie en flux. Les pourcentages des cellules DiOC₆(3) négatives, HE positives et IP positives ont été déterminés par cytométrie en flux. Les corrélations ont été calculées avec le test de corrélation de Pearson.

Les cellules 158N et BV-2 traitées avec 7KC, 24S-OHC, et C24:0 pendant 24 et / ou 48 h ont montré une perte de $\Delta\Psi_m$, évaluée par une augmentation du pourcentage de cellules DiOC₆(3) négatives associée à une surproduction d'O₂^{•-} et à une perméabilisation de la membrane cytoplasmique.

L'analyse des corrélations entre le niveau d'expression de Kv3.1b et le pourcentage des cellules DiOC₆(3) négatives, DHE et IP positives, sur les cellules 158N traitées pendant 24 h avec 7KC (2,5; 12,5 et 25 μ M), 24S-OHC (2,5; 12,5 et 25 μ M) ou C24:0 (1, 5, 10 et 20 μ M), a montré une corrélation positive dans les cellules 158N traitées avec 7KC et 24S-OHC, et

aucune corrélation avec le C24:0 (**Figure 62**).

Par ailleurs, des corrélations significatives entre l'expression de Kv3.1b et le pourcentage des cellules DiOC₆(3) négatives ont été évaluées après traitement des cellules BV-2 pendant 24 h avec le 7KC, 24S-OHC et C24:0. L'expression de Kv3.1b est également positivement corrélée avec la surproduction du d'O₂^{•-} et la perte de l'intégrité de la membrane plasmique en présence de 24S-OHC (**Figure 63**). Après 48 h de traitement, les résultats ont montrés une corrélation positive entre l'expression de Kv3.1b et le différents paramètres analysés en présence de 7KC et 24S-OHC alors qu'aucune corrélation n'a été observée avec C24:0 (**Figure 62**).

3. Effets du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur le courant Kv3.1

Les tests électrophysiologiques ont été entrepris pour décrire le mode d'action de 7KC et 24S-OHC et C24:0 sur le courant du canal Kv3.1 exprimé dans les ovocytes de xénopes par la technique de voltage clamp en doubles microélectrodes intracellulaires. Cependant, en l'absence de données bibliographiques sur leur action ainsi que sur celle des solvants utilisés sur les canaux ioniques, il était nécessaire de tester séparément leurs effets sur les courants K⁺ endogènes de l'ovocyte pour éviter toute interaction avec ceux du courant Kv3.1.

3.1 Effet de l'éthanol et de l' α -cyclodextrine sur le courant endogène de l'ovocyte de xénope

Nous avons commencé par étudier l'effet des solvants éthanol et α -cyclodextrine sur le courant endogène de l'ovocyte de xénope en application instantanée et après 6 et 24 h d'incubation.

L'éthanol à 0,05% est utilisé afin de solubiliser le 7KC et le 24S-OHC (une concentration de 0,05 % correspondant à la plus forte concentration nécessaire pour solubiliser 25 μ M de 7KC ou 24S-OHC) et l' α -cyclodextrine à 1 mM est utilisé afin de solubiliser C24:0 (1 mM correspondant à la plus forte concentration nécessaire pour solubiliser 20 μ M de C24:0).

L'étude du courant endogène de l'ovocyte de xénope en fonction du potentiel est réalisée en appliquant des créneaux de potentiel croissants de 10 en 10 mV allant de -80 à +120 mV pendant 250 ms et ce, à partir d'un potentiel de référence de -80 mV. Le blocage des courants Ca²⁺ et chlore calcium-dépendants Cl (Ca²⁺) est assuré grâce à l'absence de Ca²⁺ extracellulaire dans le milieu d'enregistrement.

Les courbes I-V traduisent la relation courant-potentiel, ils sont tracés à partir des familles de courants enregistrés. L'éthanol (0.05%) et l' α -cyclodextrine (1mM) n'agissent pas sur le courant K^+ endogène de l'ovocyte de xénope, instantanément et après 6 et 24 h incubation (Figure 63).

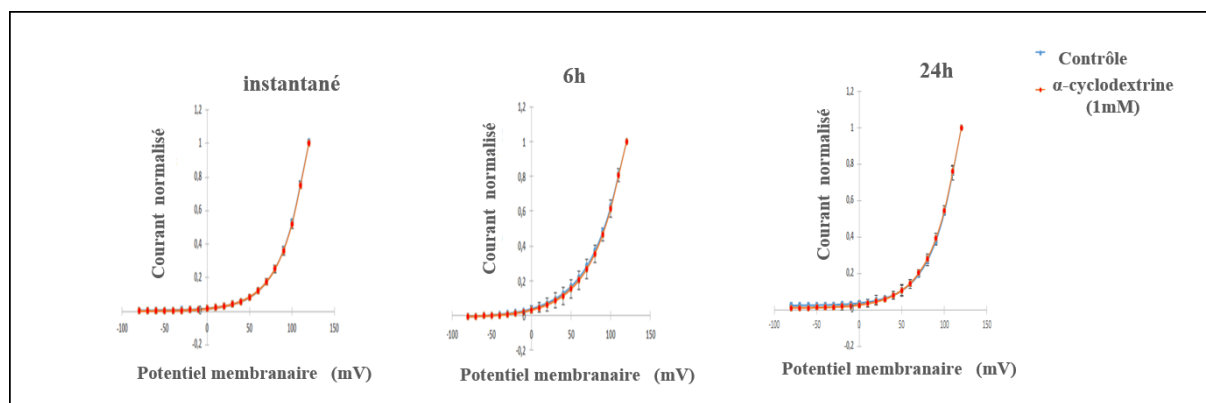


Figure 63 : Evolution du courant K^+ endogène de l'ovocyte de xénope en fonction du potentiel membranaire avant et après perfusion de α -cyclodextrine (1 mM) puis après incubation 6 et 24 h (n=10).

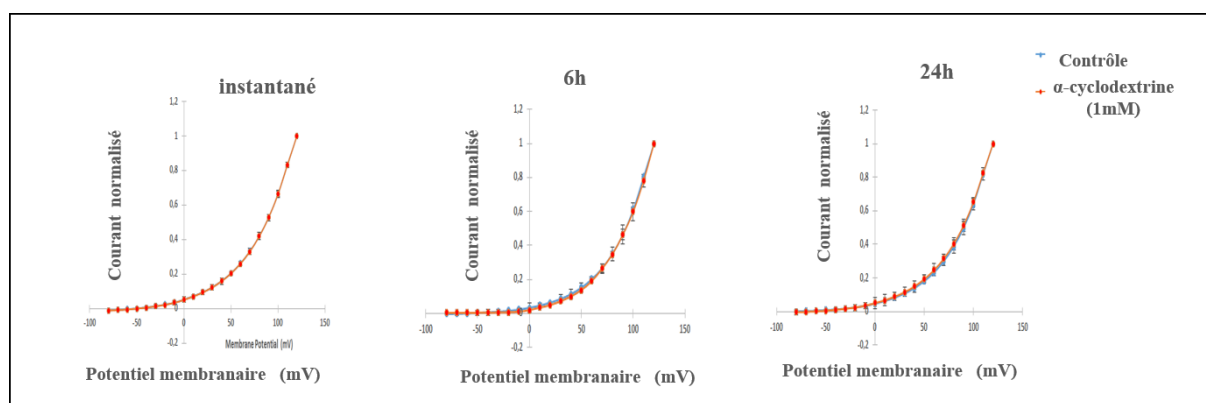


Figure 64 : Evolution du courant K^+ endogène de l'ovocyte de xénope en fonction du potentiel membranaire avant et après perfusion de éthanol (0,05%) puis après 6 et 24 h d'incubation (n=10).

3.2. Effet 7KC, 24S-OH et C24:0 sur le courant endogène de l'ovocyte de xénope

Nous avons testé l'effet du 7KC (25 μ M), 24S-OHC (25 μ M) et C24:0 (20 μ M) sur le courant endogène de l'ovocyte de xénope, en appliquant des créneaux de potentiel croissants de 10 en 10 mV allant de -80 à +70 mV pendant 250 ms et ce à partir d'un potentiel de référence de -80 mV. La moyenne des courbes I-V (n=10) avant et après l'application de 7KC (25 μ M),

24S-OHC (25 μM) et C24:0 (20 μM) ne montre aucun effet sur le courant endogène instantanément, après incubation de 6 h et 24 h (**Figure 65**).

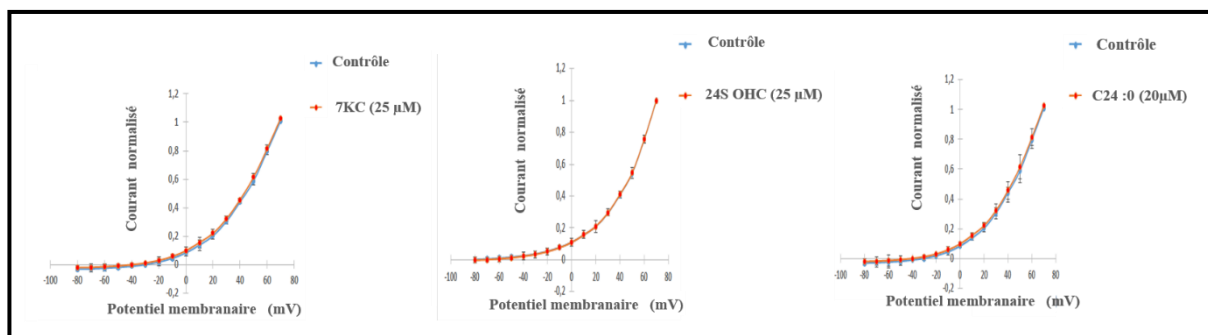


Figure 65 : Evolution du courant K^+ endogène de l'ovocyte de xénope en fonction du potentiel membranaire après 24 h d'incubation avec du 7KC, 24S-OHC et C24:0 (n=10)

3.3. Effet 7KC, 24S-OH sur le courant Kv3.1 exprimé dans l'ovocyte de xénope

L'expression fonctionnelle des canaux Kv3.1 dans l'ovocyte de xénope est étudiée en appliquant des créneaux de potentiel croissants de 10 en 10 mV allant de -80 à +60 mV pendant 250 ms. L'application instantanée de 7KC (25 μM) et 24S-OHC (25 μM) n'agit pas sur le courant Kv3.1 exprimé dans l'ovocyte de xénope. Par contre, après incubation des ovocytes pendant 24 heures, 7KC (25 μM) et 24S-OHC (25 μM) inhibent le courant Kv3.1 avec une moyenne de 28 % et de 37 % respectivement (n=3) (**Figure 66**).

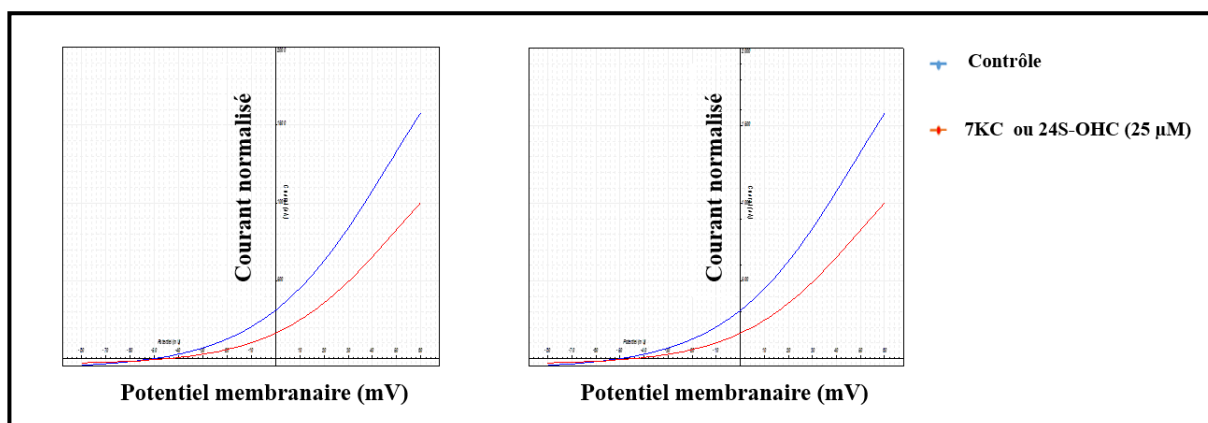


Figure 66 : Evolution du courant potassium Kv3.1 en fonction du potentiel membranaire après 24 h d'incubation avec du 7KC et 24S-OHC (n=3)

La courbe d'activation relative normalisée par rapport à la conductance maximale (g_{max}) avant et après perfusion par 7KC (25 μ M) montre que le 7KC n'agit pas sur le seuil d'activation du canal mais déplace celui-ci vers des potentiels plus positifs.

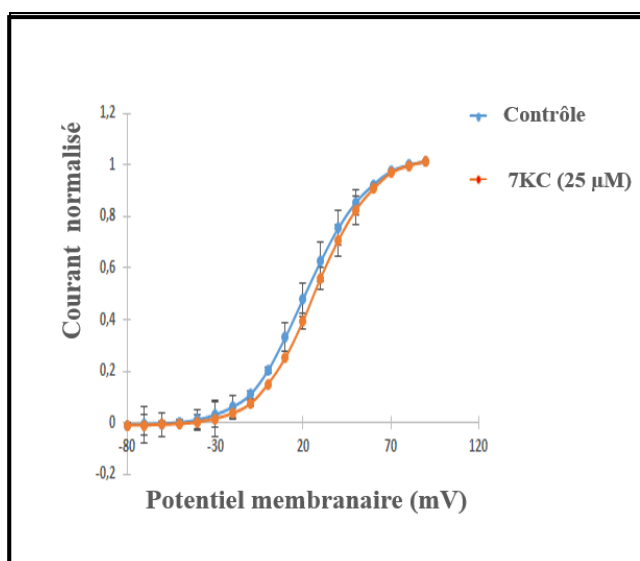


Figure 67 : Courbe d'activation du canal Kv3.1 g/g_{max} en fonction du potentiel membranaire, avant et après la perfusion de 7KC (25 μ M)

B. Relations entre le taux de potassium plasmatique et le métabolisme peroxysomal chez des patients Alzheimer tunisiens

Une étude antérieure sur une cohorte de malades Alzheimer tunisiens suggère des dysfonctions du peroxysome dans cette pathologie (Zarrouk *et al.*, 2015). En effet, les taux de C26:0 (mais aussi de C24:0 à un degré moindre) étaient très fortement augmentés dans le plasma et les membranes des erythrocytes de MA. Ceci a conduit à proposer le C26:0 comme potentiel biomarqueur sanguin de la MA. A ce jour, les relations entre les ions impliqués dans la conduction de l'influx nerveux et le métabolisme lipidique sont encore peu étudiées. Sur la base des résultats obtenus *in vitro* sur les oligodendrocytes 158N et les cellules microgliales BV-2, nous avons cherché à préciser les éventuelles corrélations entre le taux de potassium plasmatique et le métabolisme lipidique peroxysomal. Les paramètres retenus pour aborder le métabolisme peroxysomal relatif à la β -oxydation sont des acides gras supérieurs ou égal à C22:0 incluant C22:0, C24:0 et C26:0 et DHA (C22:6 n-3). Parmi ces acides gras, comparativement aux contrôles des variations significatives sont observées ($P < 0.05$)

(Tableau 7). Seul le C26:0 est significativement augmenté avec $P < 0,001$. Ces résultats ont été confirmés sur une seconde cohorte tunisienne (Thèse de Doctorat, Debbabi M, 2017). Les taux de potassium disponibles dans la première étude ont été mesurés dans les bonnes conditions (moins de 30 min après le prélèvement sanguin). Ils ont révélé une corrélation négative entre le taux de DHA plasmatique et la concentration de K^+ (Tableau 8). Cette observation renforce l'hypothèse selon laquelle des facteurs environnementaux, tels que l'homéostasie potassique, pourraient influencer la biogénèse et / ou la fonction peroxysomale.

Tableau 7: Valeurs moyennes des taux plasmatiques de C22:0, AGTLCs et DHA chez les patients Alzheimer et les contrôles.

	Contrôles	Alzheimer
C22:0 (μM)	0.30 \pm 0.12	0.57 \pm 0.33*
C24:0 (μM)	0.17 \pm 0.05	1.16 \pm 0.78*
C26:0 (μM)	0.10 \pm 0.05	2.26 \pm 1.07**
C22:6 (μM)	1.43 \pm 0.27	0.38 \pm 0.14 *
Σ AGTLC (μM)	3.38 \pm 1.87	7.12 \pm 2.46 *

Les profils de C22:0, des AGTLCs (C24:0 et C26:0) et du DHA (C22:6 n-3) dans le plasma des patients Alzheimer et des contrôles ont été déterminés par CPG / SM. Les données obtenues sont exprimées sous la forme de valeurs moyennes de chaque groupe \pm SD. Les différences significatives entre les patients Alzheimer et les contrôles ont été calculées par le test de Mann-Whitney avec la correction de Bonferroni. Ces différences sont indiquées par * $P < 0.05$; ** $p < 0,001$.

Tableau 8 : Corrélation de Spearman entre concentrations plasmatiques de potassium et de C22:0, AGTLCs (C24:0 et C26:0) et DHA (C22:6 n-3)

	Acides gras mesurés			
	C22:0	C24:0	C26:0	C22:6
Rho de Spearman	-0,31	-0,25	-0,007	-0,056
P	0,27	0,37	0,98	0,035

C. Etude de l'expression de Kv3.1b sur des souris transgéniques J20 utilisées comme modèle de la maladie d'Alzheimer

Pour aborder d'éventuelles relations entre l'expression de Kv3.1b et des altérations décrites chez des patients atteints de MA (dérèglement du métabolisme des lipides et le dysfonctionnement peroxysomal) nous avons initié une étude sur des coupes de cerveaux de souris transgéniques J20 modèle de la MA.

L'expression de Kv3.1b et d'Abcd3 (marqueur de masse peroxysomal) ainsi que les profils lipidiques (acide gras, cholestérol et oxystérols) au niveau périphérique (plasma et érythrocytes) ont été étudiés sur des souris transgéniques J20 femelles âgées de 9 mois et des souris contrôles femelles de même fond génétique et de même âge pour tenir compte des altérations liées au vieillissement.

Ces différentes analyses ont pour objectifs de définir si la distribution de Kv3.1b dépend de l'amyloïdogénèse, du taux de peroxysomes et du profil lipidique.

Ces différents points ont été abordés par des études immunohistologiques et immunohistochimiques réalisées sur coupes sagittales de cerveaux (coloration Rouge Congo et utilisation d'anticorps anti A β , anti Kv3.1b, et anti Abcd3) et par une analyse du profil des acides gras, de cholestérol et d'oxystérols par CPG / SM.

Nous avons choisi de travailler (pour l'immunohistochimie et la biochimie) sur des souris J20 âgées de 9 mois pour être dans des conditions d'amyloïdogénèse dans toutes les souris.

1. Analyses comportementales

Le modèle de souris J20 a été choisi pour mettre en évidence l'impact de l'amyloïdogénèse sur l'expression du Kv3.1b et d'Abcd3 ainsi que sur le métabolisme lipidique peroxysomal. Nous avons procédé, en premier, à valider l'atteinte de la mémoire de travail de ces animaux par le test du labyrinthe en Y qui a été mis en œuvre sur des souris âgées de 6 mois. Ce test mesure la mémoire immédiate des souris, en évaluant leur mémoire spatiale à court terme dans un labyrinthe à 3 branches. La performance des animaux est reflétée par le pourcentage d'alternances spontanées observées au cours du test.

Le groupe des souris transgéniques J20, en phase d'installation des plaques amyloïdes, présentent des altérations importantes de leur mémoire de travail. En effet, on note une réduction du pourcentage d'alternances spontanées de 15% par rapport aux souris contrôles

(Figure 68). De plus, nous avons observé que le nombre d'entrées dans les bras connus du labyrinthe par les souris transgéniques est plus important par rapport aux souris contrôles (Figure 69). Ces observations signifient que les capacités locomotrices, sensorielles, motivationnelles, exploratoires sont plus affectées chez les souris J20. Ce modèle présente donc de caractéristiques pathologiques qui se rapprochent de la MA.

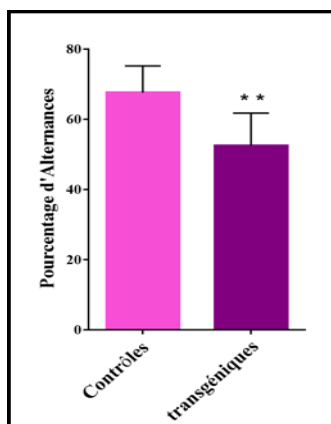


Figure 68 : Exploration de la mémoire de travail : pourcentage d'alternances spontanées des différents groupes expérimentaux dans le labyrinthe en Y

Le pourcentage d'alternances spontanées a été enregistré pour chaque groupe de souris pendant les 5 min du test. Une alternance spontanée est considérée comme correcte lorsque la souris passe successivement dans les 3 bras du labyrinthe. Le pourcentage d'alternances est défini comme le ratio du nombre d'alternances correctes sur le nombre d'alternances possibles, ramené à 100%. Les données sont représentées comme la moyenne +/- SD du pourcentage d'alternances spontanées de chaque groupe de souris.

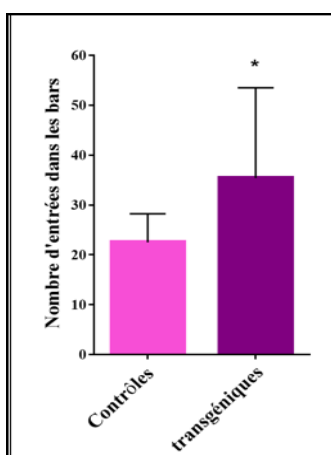


Figure 69 : Exploration des capacités locomotrices des souris : nombres d'entrées totales réalisées dans les bras du labyrinthe en Y

Le nombre d'entrées dans chacun des 3 bras du labyrinthe a été enregistré au cours des 5 min du test. L'entrée dans un bras est considérée comme valide lorsque la patte postérieure de la souris a franchi la limite du bras considéré. Les données sont représentées comme la moyenne +/- SD du nombre total d'entrées dans les bras du labyrinthe pour chaque groupe de souris.

2. Révélation des dépôts amyloïdes sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris transgéniques J20

La MA est une maladie amyloïde qui se caractérise par la présence de dépôts extracellulaires formés principalement du peptide A β extracellulaires insolubles et toxiques. La présence de ces dépôts dans notre modèle d'étude, souris J20, a été évaluée par immunohistochimie à l'aide de l'anticorps monoclonal reconnaissant la séquence peptidique 17-24. Le changement conformationnel du peptide A β est associé à la formation des plaques séniles ou neuritiques. La formation des plaques séniles a été mise en évidence avec des méthodes immunohistologiques par coloration au rouge Congo et à la thioflavine T (molécules fluorescentes) révélant spécifiquement la structure secondaire en feuillets β plissés.

L'utilisation de l'anticorps anti-A β 17-24 révèle la présence des dépôts amyloïdes au niveau au niveau des régions hippocampiques et corticales associatives chez les souris transgéniques J20 (**Figure 70**). De même, la coloration rouge Congo révèle la présence des plaques séniles extracellulaires au niveau de ses régions (**Figure 71**). Ces structures présentes chez toutes les souris J20, sont absentes chez les souris sauvages du même âge et de même fond génétique.

Ce marqueur conventionnel de la MA (présence des plaques séniles) valide bien l'utilisation des souris J20 à l'âge de 36 semaines.

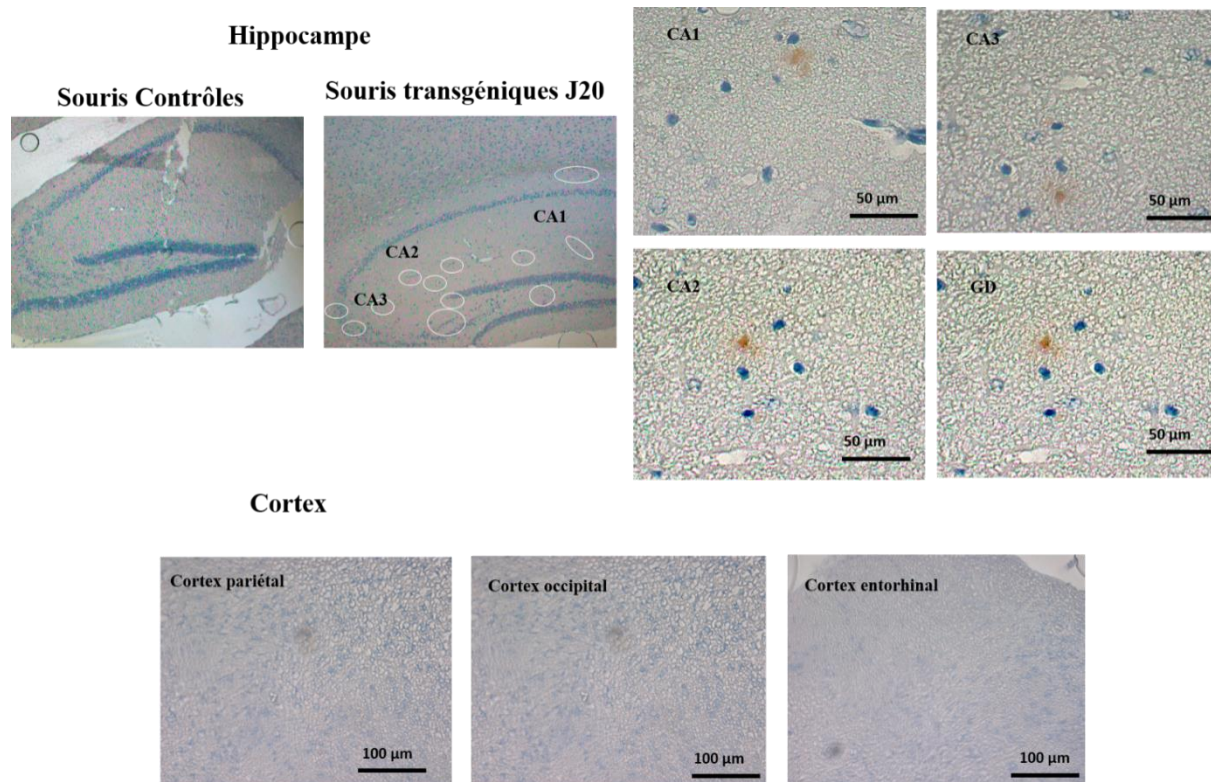


Figure 70 : Marquage immunohistochimique du peptide A β 17-24 dans les régions hippocampiques (CA1, CA2, CA3 et GD) et l'ensemble des cortex occipital, pariétal et entorhinal sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois; CA : Corne d'Ammon, GD : gyrus denté. Coupes d'épaisseur 8 μ m ; révélation de l'expression antigénique à la DAB et contre coloration à l'hémalun

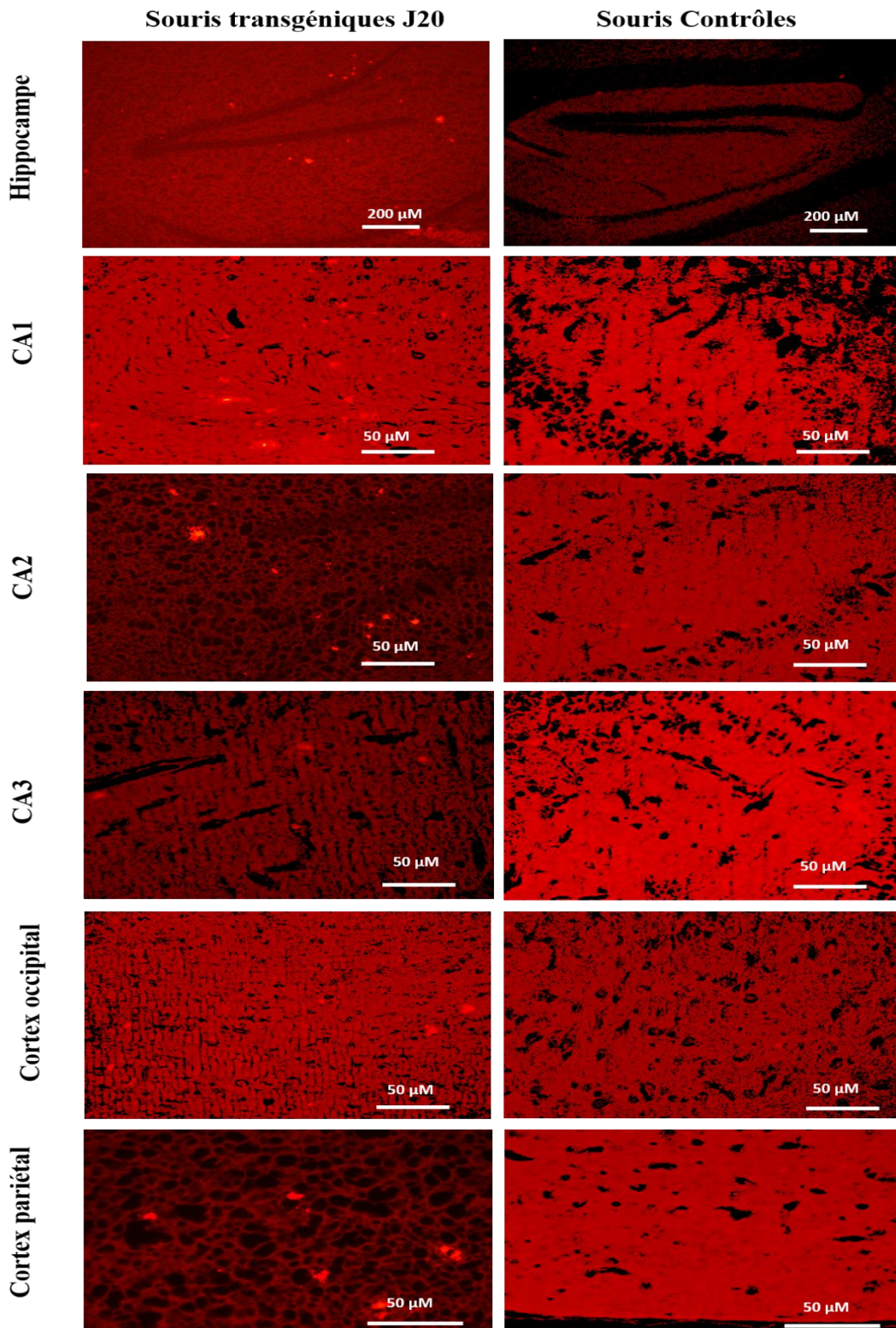


Figure 71 : Coloration immunohistologique des plaques séniles dans les régions hippocampiques (CA1, CA2, CA3 et DG) et dans l'ensemble des cortex occipital, pariétal et entorhinal sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois; GD : gyrus denté, CA : Corne d'Ammon.

3. Etude de l'expression de Kv3.1b et du marqueur de masse peroxysomale (Abcd3) sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris transgéniques J20

Une analyse topographique régionale de Kv3.1b et d'Abcd3 (marqueur de masse peroxysomale) a été réalisée par marquage en immunohistochimie. L'observation de Kv3.1b et d'Abcd3 par microscopie montre un marquage général de la représentation sagittale des tissus cérébraux des deux groupes de souris épargnant principalement l'hippocampe, l'ensemble des cortex et le cervelet.

Cette vision globale de l'expression de Kv3.1b et d'Abcd3 ne nous permet pas de distinguer des différences entre les cerveaux développant ou non une amyloïdogénèse.

L'évaluation quantitative du marquage Kv3.1b et Abcd3 nous a permis d'étudier leurs niveaux d'expression dans le groupe de souris transgéniques, en comparaison avec les souris contrôles dans plusieurs structures cérébrales des souris J20 : l'hippocampe, dans les cellules pyramidales de la corne d'Ammon (CA1, CA2 et CA3), dans la couche polymorphe et la couche granuleuse du gyrus denté, dans le subiculum et dans l'ensemble des cortex cérébraux. Une diminution significative de l'expression de Kv3.1b est observée chez les souris J20 au niveau du gyrus denté et du cortex occipital. Par ailleurs, il n'y a aucun effet de la charge amyloïde sur l'expression de Kv3.1b au niveau des aires CA1, CA2 et CA3, au niveau du subiculum et dans l'ensemble des cortex pariétal, entorhinal et frontal (**Figure 72-73-74**). Au niveau du cervelet, Kv3.1b est très faiblement exprimé par les cellules de Purkinje (**Figure 78**).

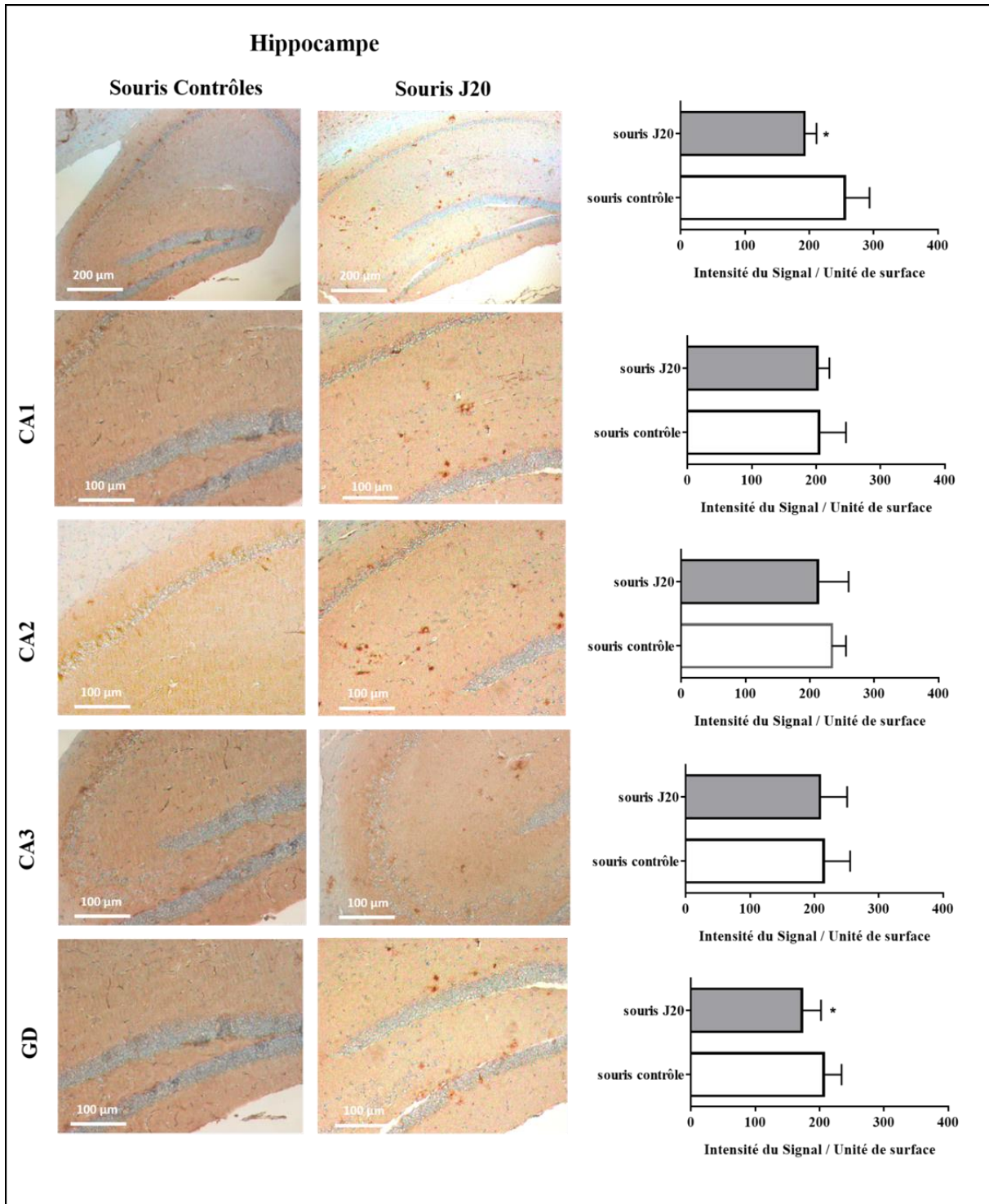


Figure 72 : Expression de Kv3.1b dans les régions hippocampiques (CA1, CA2, CA3 et GD) sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois ; CA : Corne d'Ammon, GD : gyrus denté. Coupes d'épaisseur 8 µm ; révélation de l'expression antigénique à la DAB et contre coloration à l'hémalun

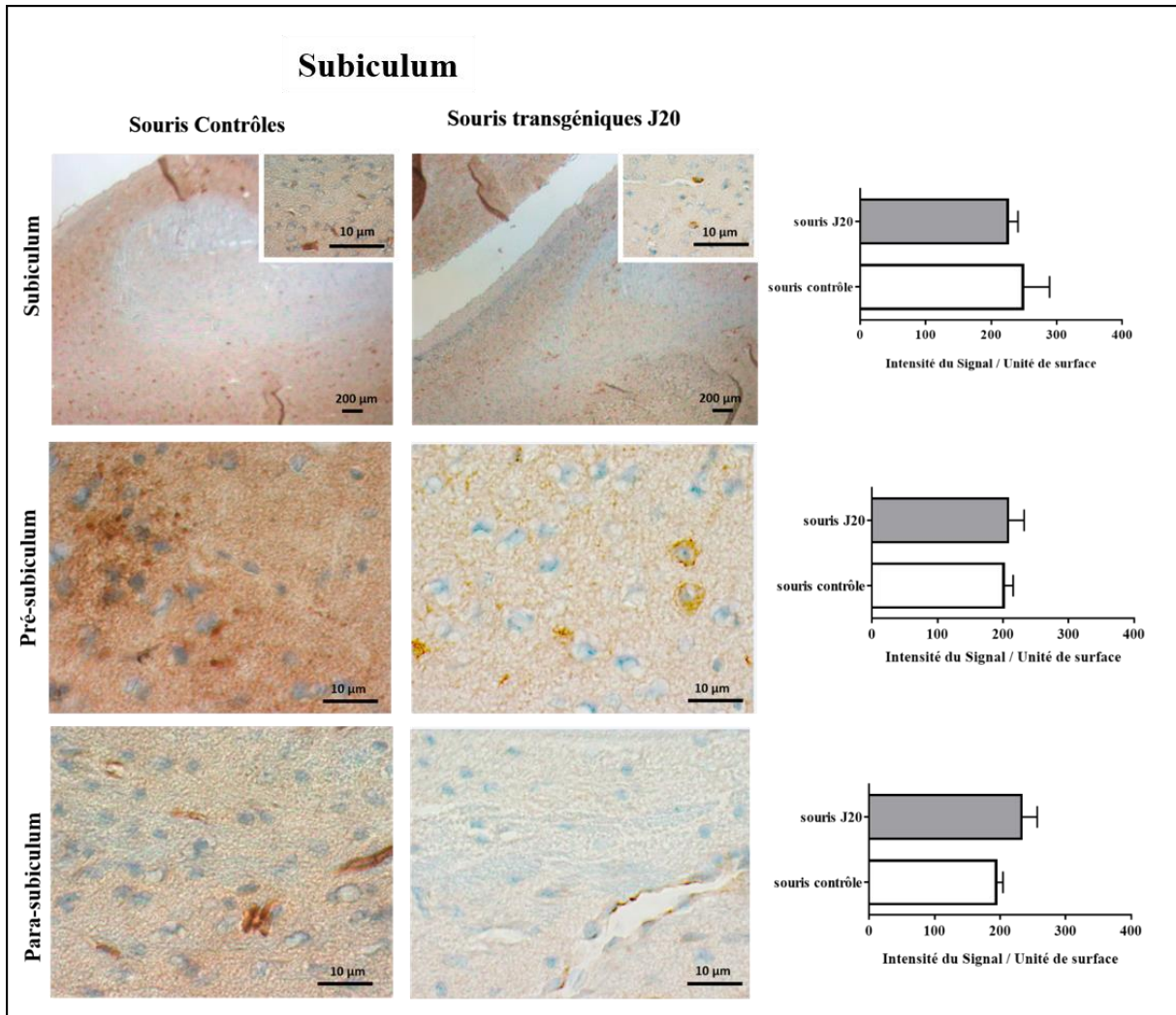


Figure 73 : Expression de Kv3.1b dans le subiculum sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois. Coupes d'épaisseur 8 µm ; révélation de l'expression antigénique à la DAB et contre coloration à l'hémalum

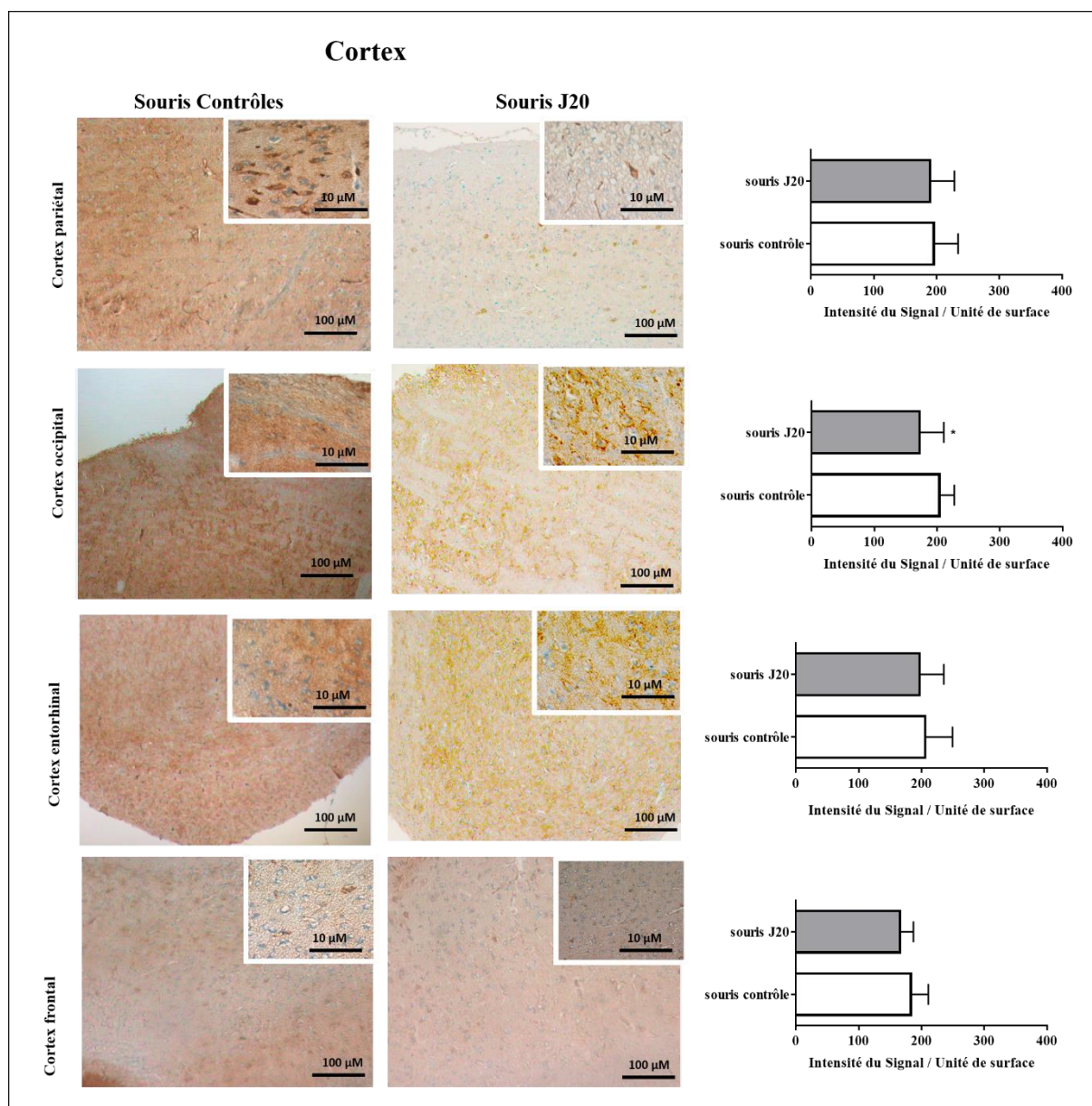


Figure 74 : Expression de Kv3.1b dans l'ensemble des cortex pariétal, occipital, entorhinal et frontal sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois. Coupes d'épaisseur 8 µm ; révélation de l'expression à la DAB et contre coloration à l'hémalun

La quantification de l'intensité du marquage d'Abcd3 souligne une diminution du niveau d'expression de ce marqueur peroxysomal dans plusieurs structures cérébrales des souris J20 : l'hippocampe, dans les cellules pyramidales de la corne d'Ammon (CA1, CA2 et CA3), dans la couche polymorphe et la couche granuleuse du GD mais pas dans le subiculum et dans l'ensemble des cortex cérébraux sauf le cortex occipital. Ceci suggère une diminution du

nombre des peroxysomes au niveau de ces régions (hippocampiques ou corticales) (**Figures 75-76-77**). Il est intéressant de noter une importante expression d'Abcd3 au niveau des cellules de Purkinje, exprimant très faiblement Kv3.1b, et ce quel que soit le groupe de souris normale ou Alzheimer (**Figure 78**).

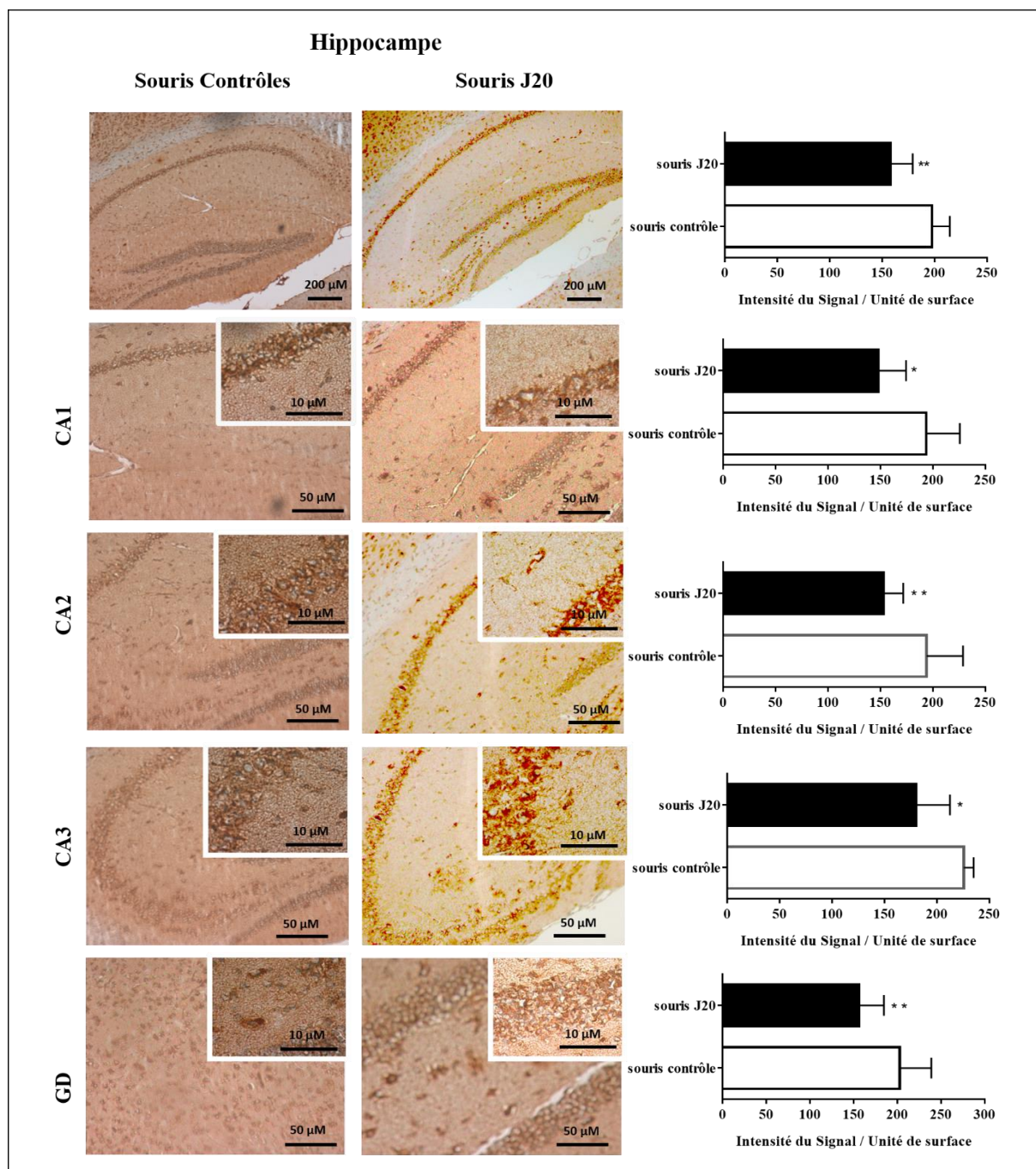


Figure 75 : Expression d'Abcd3 dans les régions hippocampiques (CA1, CA2, CA3 et GD) sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois; CA : Corne d'Ammon, GD : gyrus denté. Coupes d'épaisseur 8 µm ; révélation de l'expression antigénique à la DAB et contre coloration à l'hémalun.

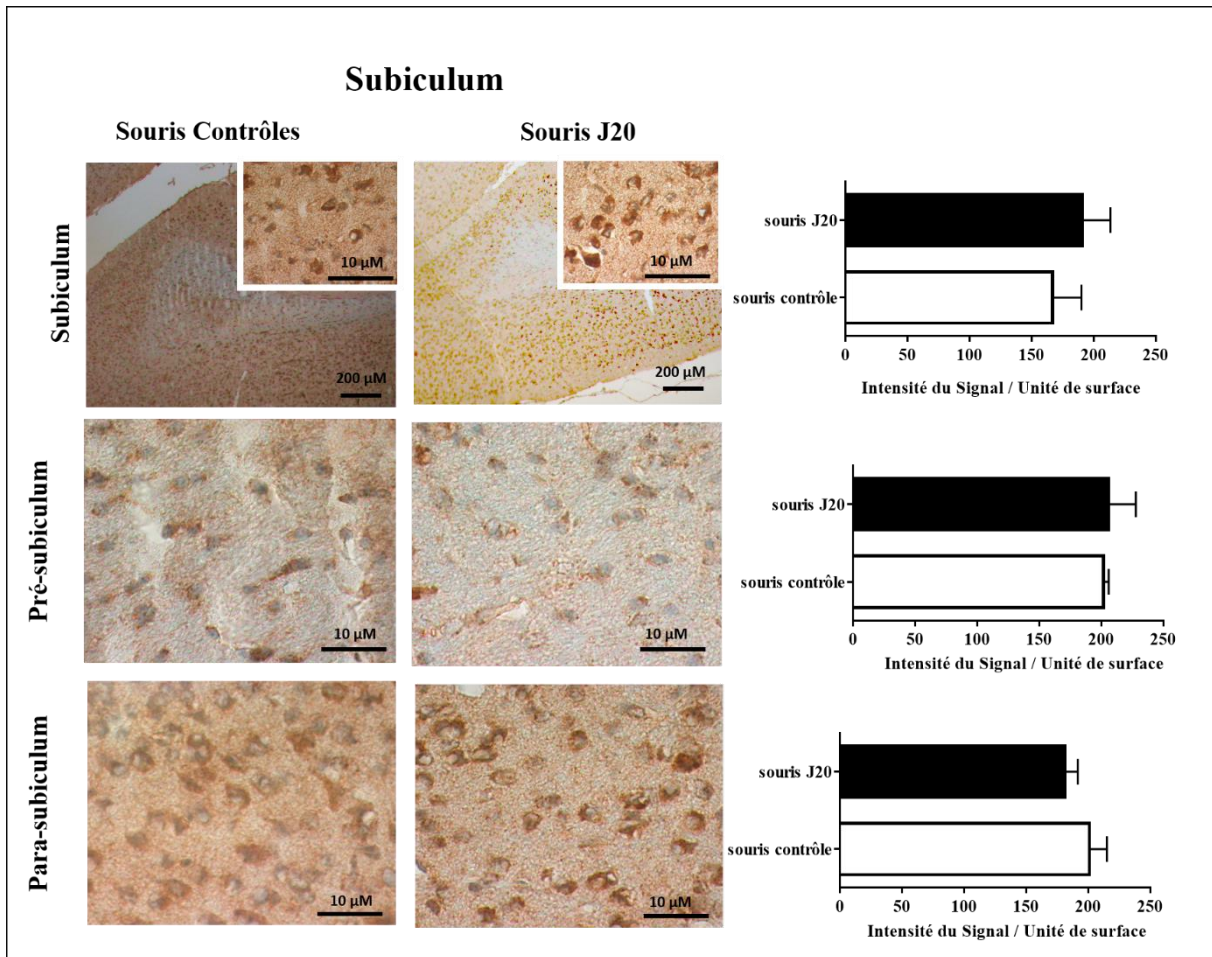


Figure 76 : Expression d'Abcd 3 dans le subiculum sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois. Coupes d'épaisseur 8 μm ; révélation de l'expression antigénique à la DAB et contre coloration à l'hémalun.

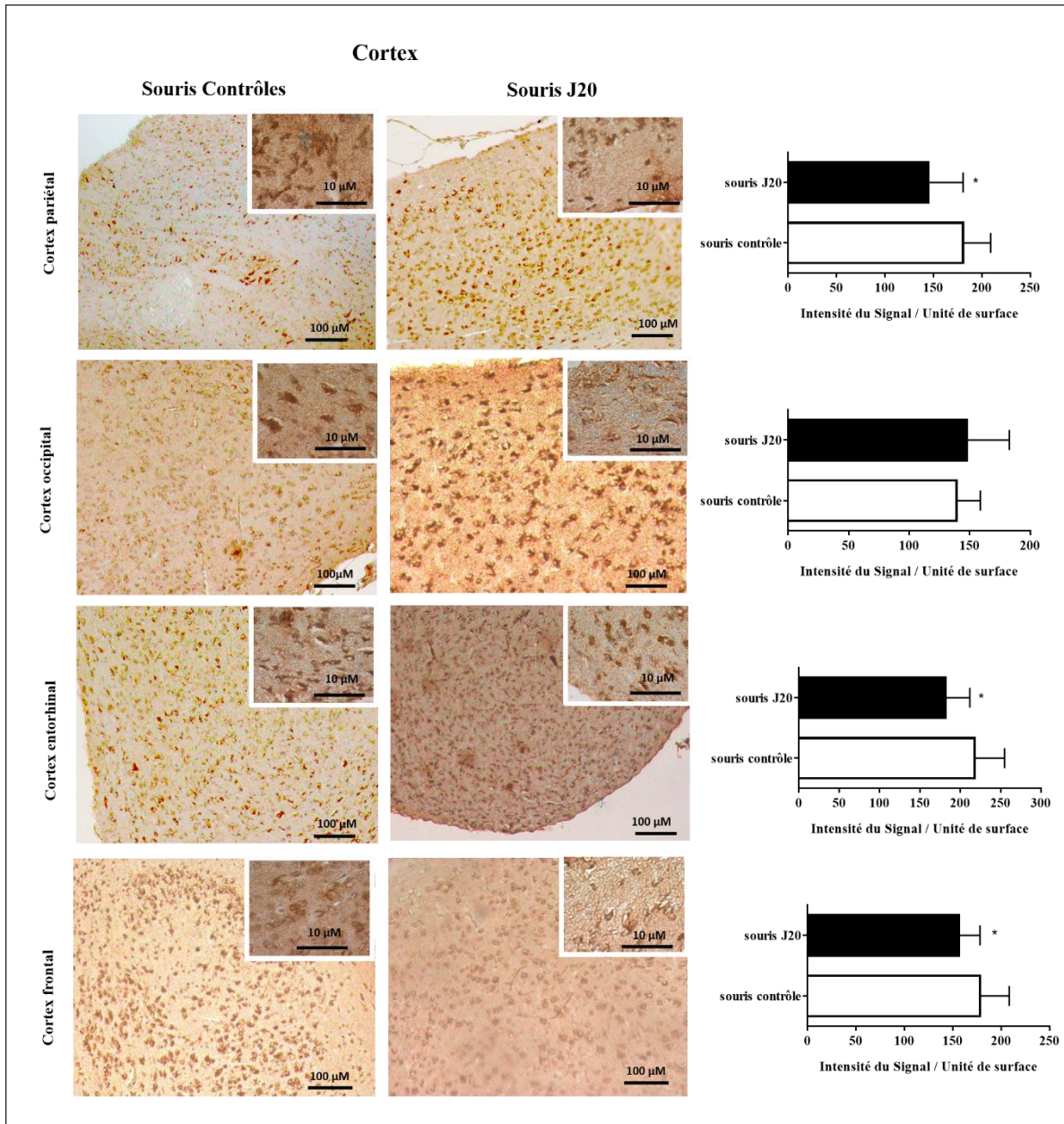


Figure 77 : Expression d'Abcd3 dans l'ensemble des cortex pariétal, occipital, entorhinal et frontal sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois. Coupes d'épaisseur 8 μm ; révélation de l'expression antigénique à la DAB et contre coloration à l'hémalum.

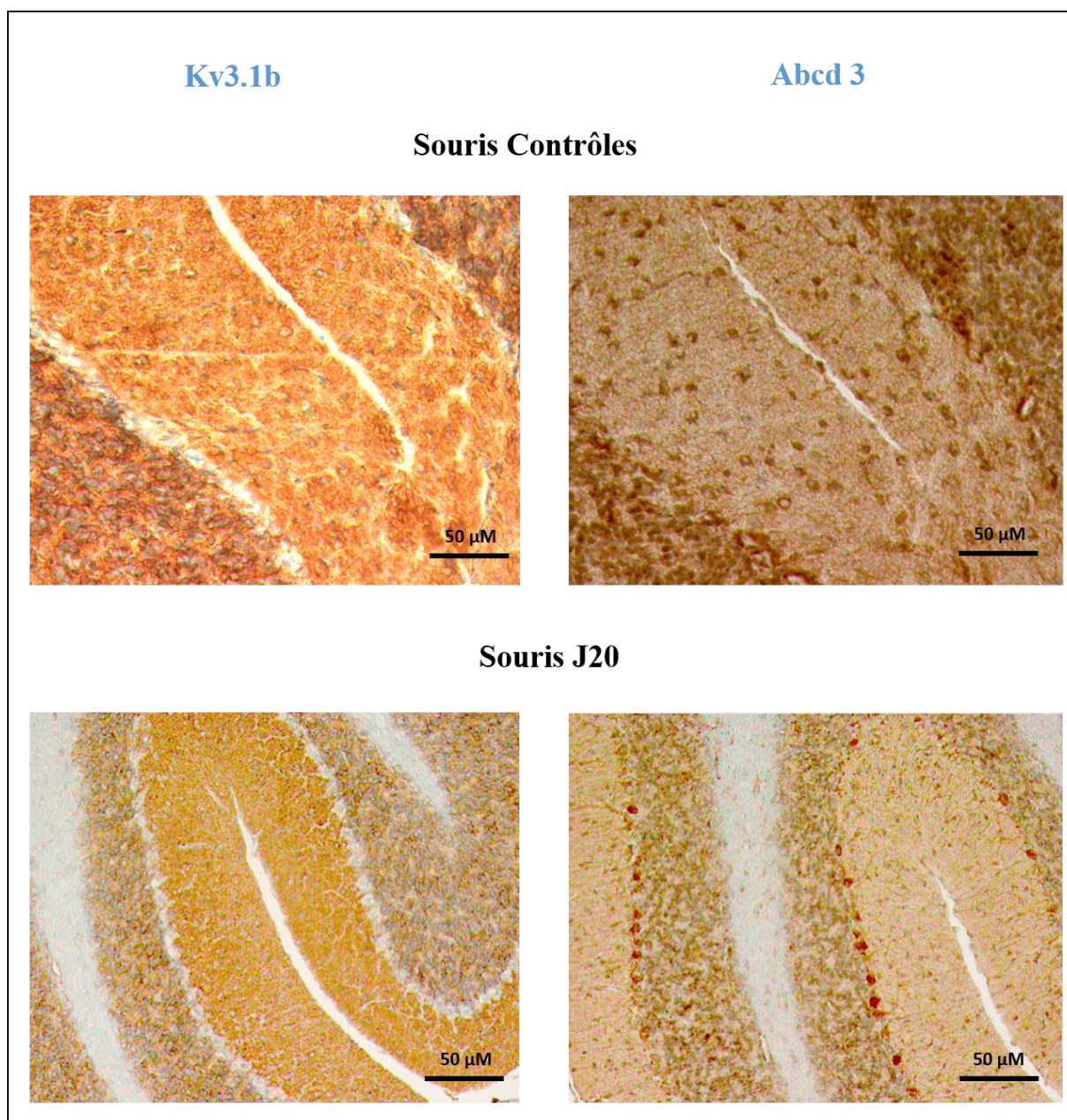


Figure 78 : Topographie de Kv3.1b et d'Abcd3 au niveau des cellules de Purkinje (cervelet) sur coupes histologiques sagittales de cerveaux de souris contrôles et transgéniques J20 femelles de 9 mois Coupes d'épaisseur 8 µm ; révélation de l'expression antigénique à la DAB et contre coloration à l'hémalun.

3. Profil d'acides gras et d'oxystérols plasmatique et érythrocytaire

La baisse du nombre de peroxysomes chez les souris transgéniques J20 renseigne sur une dérégulation du métabolisme lipidique. La réduction du nombre des peroxysomes pourrait s'accompagner d'une altération de la β -oxydation peroxysomale et par conséquent d'une accumulation de C22:0, d'AGTLC (C24:0 et C26:0), de l' α -oxydation de l'acide phytanique

ainsi que de la synthèse du DHA (C22:6 n-3), et des plasmalogènes. En regard des résultats d'immunohistochimie et des travaux antérieurs montrant que les AGTLC, plus particulièrement le C26:0, comme puissant biomarqueur de la MA, nous avons déterminé les taux plasmatiques et érythrocytaires de C22:0 et d'AGTLCs (C24:0 et C26:0) ainsi que de plasmalogènes C16:0 par CPG / SM.

Le dosage de C22:0 et des AGTLCs (C24:0 et C26:0) souligne une augmentation des taux de ces acides gras au niveau plasmatique, sans que cette différence atteigne la significativité, ce qui pourrait être expliqué par la grande variabilité interindividuelle. La comparaison des taux de C22:0 et des AGTLCs (C24:0 et C26:0) entre groupe contrôles et groupe de souris transgéniques montre une légère augmentation comparativement à deux souris contrôles par contre les deux autres souris ont des taux équivalents à ceux des souris J20. La concentration plasmatique du C22:0 dans le groupe des souris J20 est de $1,25 \pm 0,37 \mu\text{M}$ comparativement à $0,96 \pm 0,36 \mu\text{M}$ chez les souris contrôles. Le taux du C24:0, de $1,03 \pm 0,29 \mu\text{M}$ chez les souris contrôles passe à $1,20 \pm 0,29 \mu\text{M}$ chez les souris J20 et celui de C26:0 passe de $0,12 \pm 0,06 \mu\text{M}$ à $0,16 \pm 0,05 \mu\text{M}$. La quantification de la charge érythrocytaire en C22:0 et en AGTLC des souris J20 ne montre aucune différence significative chez les souris J20 comparativement aux souris contrôles (C22:0 : $1,30 \pm 0,48 \mu\text{M}$; $1,39 \pm 0,19 \mu\text{M}$, C24:0 : $2,34 \pm 0,90 \mu\text{M}$; $2,40 \pm 0,39 \mu\text{M}$ et C26:0: $0,92 \mu\text{M} \pm 0,40$; $0,92 \pm 0,22 \mu\text{M}$) (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Profil plasmatique et érythrocytaire des acides gras en relation avec le métabolisme peroxysomal chez les souris transgéniques J20 et les contrôles

	<i>Souris Contrôles</i>		<i>Souris J20</i>	
	<i>Plasma</i>	<i>Erythrocytes</i>	<i>Plasma</i>	<i>Erythrocytes</i>
C22:0 (μM)	$0,96 \pm 0,36$	$1,39 \pm 0,19$	$1,25 \pm 0,38$	$1,30 \pm 0,45$
C24:0 (μM)	$1,03 \pm 0,29$	$2,40 \pm 0,32$	$1,20 \pm 0,29$	$2,34 \pm 0,81$
C26:0 (μM)	$0,12 \pm 0,06$	$0,92 \pm 0,22$	$0,16 \pm 0,04$	$0,92 \pm 0,34$
C22:6 (μM)	$5,32 \pm 0,57$	$3,67 \pm 0,47$	$5,97 \pm 1,56$	$3,07 \pm 1,32$
Σ AGTLC (μM)	$2,13 \pm 0,49$	$4,72 \pm 0,69$	$2,61 \pm 0,58$	$4,56 \pm 0,86$

Les profils de C22:0, des AGTLCs (C24:0 et C26:0) et du DHA (C22:6 n-3) dans le plasma et les érythrocytes des souris transgéniques J20 et des souris contrôles sont déterminés par CPG/ SM. Les données obtenues sont exprimées sous la forme de valeurs moyennes de chaque groupe \pm SD. L'analyse statistique des données a été faite par le test Anova (Sidak's multiple comparisons).

Le cholestérol et les oxystérols sont souvent associés au développement de maladies neurodégénératives en particulier la MA. L'environnement amyloïde est caractérisé par une surproduction des espèces radicalaires de l'oxygène ce qui pourrait induire l'auto-oxydation du cholestérol et être à l'origine de la production de dérivés oxydés sur le carbone 7 (7KC, 7 β -OHC et 7 α -OHC) et éventuellement 25 (25-OHC). Le taux des oxystérols dérivant de l'oxydation enzymatique du cholestérol (7 α -OHC, 24S-OHC, 27-OHC et 25OHC) sont également modifiés dans le cas de la MA. Le calcul du rapport entre le taux des oxystérols et le taux du cholestérol plasmatique et érythrocytaire chez les souris J20 ne montre pas de modulation significative comparativement aux contrôles. La somme des oxystérols produits par autoxydation du cholestérol (7KC et 7 β -OHC) montre une augmentation significative chez les souris J20 dont la quantité passe de $1,06 \pm 0,18$ à $1,6 \pm 0,22$ (ng/mL) témoignant d'une peroxydation plus importante des lipides chez les souris J20 (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Profil plasmatique et érythrocytaire des oxystérols chez les souris transgéniques J20 et contrôles

<i>Oxystérols (ng/mL)</i>	<i>Souris Contrôle</i>		<i>Souris J20</i>	
	<i>Plasma</i>	<i>Erythrocytes</i>	<i>Plasma</i>	<i>Erythrocytes</i>
7KC	0,38 \pm 0,05 (-1mM)	0,51 \pm 0,74	0,33 \pm 0,04	0,62 \pm 0,23
7β-OHC	0,32 \pm 0,02	0,54 \pm 0,71	0,34 \pm 0,04	0,93 \pm 0,39
7α-OHC	0,30 \pm 0,05	0,32 \pm 0,39	0,33 \pm 0,06	0,58 \pm 0,19
24S-OHC	0,19 \pm 0,05	0,10 \pm 0,10	0,23 \pm 0,03	0,26 \pm 0,10
27-OHC	0,46 \pm 0,18	0,18 \pm 0,18	0,56 \pm 0,06	0,57 \pm 0,27
25-OHC	0,12 \pm 0,06	0,05 \pm 0,08	0,11 \pm 0,04	0,18 \pm 0,08
7KC+7β-OHC	0,71 \pm 0,06	1,06 \pm 0,18	0,68 \pm 0,06	1,6 \pm 0,22*

Les profils des oxystérols dans le plasma et les érythrocytes des souris transgéniques J20 et des souris contrôles sont déterminés par CPG / SM. Les données obtenues sont exprimées sous la forme de valeurs moyennes de chaque groupe \pm SD. L'analyse statistique des données a été faite par le test Anova (Sidak's multiple comparisons) et indiquée par * $p < 0,001$.

DISCUSSION

La physiopathologie des maladies neurodégénératives démyélinisantes ou non est associée à des anomalies du métabolisme lipidique, à une rupture de l'équilibre RedOx, à de l'inflammation et à une perturbation de l'influx nerveux aboutissant à la dégénérescence des cellules du SN (Wood *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2014). Des teneurs cérébrales et plasmatiques élevées en oxystérols et en AGTLC ont souvent été détectées chez les patients atteints de différentes maladies neurodégénératives. Des taux élevés en oxystérols résultant soit de l'auto-oxydation ou de l'oxydation enzymatique du cholestérol (Zarrouk *et al.*, 2014; Lizard, 2016; Weber *et al.*, 2016; Barriusso *et al.*, 2016; Mutemberezi *et al.*, 2016), ont été identifiés dans le plasma, le liquide céphalo-rachidien (LCR) et dans le cerveau des patients atteints de MA (Björkhem, 2006; Hascalovici *et al.*, 2009; Zarrouk *et al.*, 2014; Testa *et al.*, 2016), de sclérose en plaques (Leoni *et al.*, 2002; Vande Kraats *et al.*, 2014; Novakova *et al.*, 2015; Mukhopadhyay *et al.*, 2016; Crick *et al.*, 2016; Zhornitsky *et al.*, 2016), de maladie de Parkinson (Doria *et al.*, 2016), d'X-ALD (Nury *et al.*, 2016), de maladie de Huntington (Kreilaus *et al.*, 2016; Petrov *et al.*, 2016) et de maladie de Niemann-Pick (Porter *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2014; Klinke *et al.*, 2015; Boenzi *et al.*, 2016; RoManello *et al.*, 2016; Kannenberg *et al.*, 2016). Des taux élevés d'AGTLC ont été décrits au niveau cérébral et plasmatique en cas de neurodégénérescence (Savary *et al.*, 2012 ; Trompier *et al.*, 2014). Le C24:0 et le C26:0, ont été détectés dans le plasma et les tissus de patients avec des peroxysomopathies (Singh *et al.*, 1984) et chez les patients atteints de sclérose en plaques (Moyano *et al.*, 2013; Senanayake *et al.*, 2015) et de MA (Kou *et al.*, 2011; Zarrouk *et al.*, 2015). Leur accumulation indiquerait des dysfonctions peroxysomales confortées chez les malades MA par une baisse du taux de DHA et de l'activité catalase (Lizard *et al.*, 2012).

La cytotoxicité des oxystérols et des AGTLC est bien établie sur les neurones (Zarrouk *et al.*, 2012; Nury *et al.*, 2015; Zarrouk *et al.*, 2015 a-b), les cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes) et microgliales (Hein *et al.*, 2008; Baarine *et al.*, 2012; Nury *et al.*, 2015; Nury *et al.*, 2016; Leoni *et al.*, 2016). Le terme d'oxyapoptophagie a été proposé pour décrire le type de mort cellulaire induite par le 7KC, le 7 β -OHC et le 24S-OHC ; ce dernier est caractérisé par la présence de stress oxydatif et présente, simultanément, des caractéristiques spécifiques à l'apoptose et l'autophagie (Monier *et al.*, 2003; Nury *et al.*, 2015; Klionsky *et al.*, 2016). Cependant, les voies de signalisation aboutissant à cette mort cellulaire complexe sont peu abordées et encore peu connues.

Par ailleurs, il a été prouvé que le maintien de l'homéostasie potassique joue un rôle déterminant dans le contrôle de la viabilité cellulaire et dans l'inflammation. La cytotoxicité des oxystérols est associée à une modulation du niveau d'expression et/ou d'activité des

canaux conducteurs du K^+ ; le 7KC et le 25-OHC déclenchent l'activation du récepteur P2X7 (Olivier *et al.*, 2016). Le 7KC module, également, la Na, K-ATPase et la BKCa (Duran *et al.*, 2010; Son *et al.*, 2015). Le 24S-OHC a été décrit comme un puissant modulateur allostérique hautement sélectif de N-méthyl-D-aspartate récepteurs (NMDAR) (Paul *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2016). Cependant, pour l'instant, il n'existe pas d'étude qui détermine l'impact des oxystérols et des AG sur l'homéostasie potassique ou sur l'expression et l'activité des canaux K^+ .

Il est intéressant de noter que le K^+ est impliqué dans la pathophysiologie de plusieurs troubles neuropsychiatriques associés à des déficits cognitifs tels que la schizophrénie, la dépression, la MA et l'épilepsie (Li *et al.*, 2009; Zorumski *et al.*, 2012). Ceci suggère une association potentielle entre anomalies du métabolisme lipidique, maintien de l'homéostasie potassique intracellulaire et induction de mort cellulaire. Le fait que des lipides puissent moduler l'homéostasie potassique intracellulaire constitue une question encore sans réponse. Pour répondre à cette question, nous avons déterminé si la lipotoxicité des AGTLC et des oxystérols implique le K^+ et nous avons tenté de caractériser les canaux impliqués.

Nos résultats ont montré que :

- ✓ le 7KC, le 24S-OHC et le C24:0 induisent une rétention du K^+ médiée, en partie, par les Kv.
- ✓ Le 7KC et le 24S-OHC sont des modulateurs de Kv3.1b.
- ✓ L'étude des corrélations a révélé que l'expression du Kv3.1b, la $[K^+]_i$ et l'induction de la mort cellulaire sont liées.

Pour aborder l'éventuelle association entre l'homéostasie potassique et l'altération de métabolisme lipidique, en particulier en relation avec le peroxyosome, l'étude *in vitro* a été complétée par une étude clinique. Cette dernière a révélé une corrélation négative entre le taux de DHA plasmatique et la concentration de K^+ .

L'altération du métabolisme peroxyosomal a également été étudiée chez les souris transgéniques (souris J20 ; 9 mois ; dépôts amyloïdes présents chez toutes les souris), par l'évaluation du niveau d'expression d'Abcd3 (marqueur de masse peroxyosomale) et par le dosage des AGTLC plasmatiques. Le dosage des dérivés oxydés du cholestérol chez la souris J20 a renseigné sur le contrôle de l'équilibre RedOx. Cette étude chez la souris J20 est en faveur d'une modulation de l'expression de Kv3.1b dans la physiopathologie de la MA

Justifications des modèles cellulaires et des concentrations d'oxystérols et d'AGTLC utilisés

Choix des cellules utilisées

La contribution des oligodendrocytes et des cellules microgliales est confirmée au cours du vieillissement et dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives. Dans la MA, les plaques séniles et les DNF sont les principales lésions associées à la MA, mais à elles seules, elles ne suffisent pas à provoquer d'importantes pertes neuronales. On peut effectivement retrouver ces lésions chez des individus qui ne présentent aucun signe de démence. C'est là qu'interviennent les cellules oligodendrocytaires et microgliales, troisième acteur cellulaire qui joue un rôle très important dans la MA. De nombreuses preuves ont indiqué que la démyélinisation est observée aux stades précoces de la MA qui précède l'apparition des marqueurs conventionnels spécifiques de la MA (présence de plaques séniles et de DNF). La rupture de la gaine de myéline peut se produire également lors des étapes avancées par l'inflammation et le stress oxydatif (**Hörster et al., 2005; Eichler et al., 2007**). Différentes observations ont montré qu'une prolifération des cellules microgliales est associée à la MA. L'altération du métabolisme cellulaire des oligodendrocytes et des cellules microgliales pourrait être une étape déterminante dans le processus de neurodégénérescence. Ainsi; nos travaux expérimentaux ont été réalisés sur les cellules oligodendrocytaires murines 158N et microgliales BV-2.

La lignée oligodendrocytaire murine 158N présente les marqueurs de différenciation oligodendrocytaire terminaux impliqués dans la production de la myéline (CNPase), la maturation, la maintenance et la stabilisation de la myéline (MOG) et dans la compaction de celle-ci (MBP, PLP) (**Birling et al., 1993 ; Sprinkle, 1989 ; de Vries & Hoekstra, 2000**). L'expression de ces protéines de myéline indique que la lignée oligodendrocytaire 158N constitue un outil intéressant pour évaluer les effets de molécules ou de mélanges de molécules sur des cellules présentant des caractéristiques d'oligodendrocytes matures.

Les caractéristiques associées au métabolisme lipidique dans cette lignée cellulaire ont été bien établies au laboratoire lors de travaux antérieurs. Les dysfonctionnements peroxysomaux et mitochondriaux, deux organelles fortement connectées, sont décrits dans le cas de nombreuses maladies neurodégénératives. L'expression des marqueurs peroxysomaux (Abcd1 et Abcd3), l'activité de certaines enzymes de la β -oxydation (Acox1, Mfp-2) et de l'activité catalase ont été évaluées sur 158N (**Baarine et al., 2009**). L'activité mitochondriale et le statut oxydatif ont été aussi étudiés sur 158N (**Baarine et al., 2009; Nury et al., 2015; Leoni et al., 2017**). Sur la base des résultats obtenus, ces données permettent d'utiliser les cellules 158N comme

modèle pour explorer les relations entre stress oxydatif, altérations du métabolisme lipidique et dégénérescence oligodendrocytaire. Comme la perte de myéline produite par les oligodendrocytes est associée à la pathogenèse de plusieurs maladies neurodégénératives et que cette démyélinisation expose les Kv et dérégule la production et la conduction du potentiel d'action, les cellules 158N constituent un modèle intéressant pour aborder l'impact de l'environnement lipidique sur l'homéostasie potassique et la régulation des canaux qui y sont associés. Il est connu que l'exposition des Kv au niveau de la région juxtaparanodale entraîne un efflux de K^+ par des canaux K^+ rapides ce qui empêche la dépolarisation du nœud de Ranvier et bloque la conduction axonale (Leung *et al.*, 2011). Les propriétés électrophysiologiques des oligodendrocytes ont été évoquées par Soliven *et al.* depuis 1989. Les oligodendrocytes expriment une variété des canaux K^+ y compris les canaux K^+ à rectification entrante (Kir.1-5) et les canaux K^+ à rectification sortante (Kv), principalement localisés au niveau du corps cellulaire (Soliven *et al.*, 1989). Jusqu'à présent, l'incidence de lipides sur l'homéostasie potassique et l'expression de canaux K^+ sur des oligodendrocytes n'est pas encore étudiée.

Les cellules microgliales murines BV-2 ont aussi été utilisées dans cette étude. Parmi les autres lignées microgliales figure aussi la lignée cellulaire N9 (Righi *et al.*, 1989). La production des cellules microgliales humaine à partir des cellules souches représente une nouvelle approche pour l'étude des fonctions microgliales (Leist *et al.*, 2008). Les BV-2 conservent la plupart des propriétés morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles des cellules microgliales fraîchement isolées (Blasi *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007). Elles sont fréquemment utilisées en pharmacologie et pour étudier la phagocytose, le stress oxydatif et l'inflammation (Hirt *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2005; Henn *et al.*, 2009). Les BV-2 expriment les oxydases fonctionnelles impliquées dans l'activation microgliale et l'induction des dommages neuronales (Wu *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007). Comparativement aux cellules microgliales en culture primaire, les BV-2 ont montré une régulation similaire du NO et de la production d'IFN- γ . Les BV-2 sont également capables d'activer les autres cellules gliales. Dans leur ensemble ces données suggèrent que les BV-2 peuvent dans une certaine limite se substituer aux cellules microgliales primaires et de ce fait être utilisées dans de nombreux contextes expérimentaux, y compris des études complexes d'interactions cellule-cellule. Dans notre laboratoire, les BV-2 sont utilisées pour illustrer les dysfonctions mitochondriales et peroxysomales induites par certains dérivés oxydés du cholestérol (Nury *et al.*, 2017). L'expression des transporteurs peroxysomaux (Abcd1, Abcd2, Abcd3) et des

protéines impliquées dans la β -oxydation peroxysomale (Acox-1 et Mfp-2) a été validée sur les BV-2 (Debbabi *et al.*, 2017 a-b).

Plusieurs approches ont été proposées pour expliquer le processus d'activation microgliale lors des maladies neurodégénératives tels que l'implication des canaux K^+ (Kettenmann *et al.*, 1993), les purinorécepteurs (Langosch *et al.*, 1994), les peptide reliés au gène de la calcitonine (Priller *et al.*, 1995) ainsi que les récepteurs des neurotransmetteurs (Pocock *et al.*, 2007). Le potentiel membranaire est normalement stable dans la microglie au repos, il faut habituellement un agent stimulant pour induire la dépolarisation ou l'hyperpolarisation. Plusieurs études ont révélé l'expression de Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 et Kv1.5 (Khanna *et al.*, 2001; Walz *et al.*, 2001; Fordyce *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009) par les cellules microgliales. Le canal Kv1.3 est le principal canal voltage dépendant exprimé par les cellules microgliales (Nörenberg *et al.*, 1993; Schilling *et al.*, 2000; Walz *et al.*, 2001). Rangaraju *et al.* (2015) ont montré que Kv1.3 est plus exprimé par les microglies corticales des patients atteints de MA. La présence du canal Kv1.5 a aussi été détectée chez les cellules microgliales primaires (Khanna *et al.*, 2001). Li *et al.* (2008) ont signalé l'expression de Kv1.2 par les cellules microgliales. L'expression de Kv1.1, Kv1.2 et K_{ATP} par les cellules BV-2 est liée à l'activation microgliale et module la libération de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1 β) et contrôle la production des ROS (Li *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2006). L'activation des canaux K_{ATP} mitochondriaux stimule la libération du TNF- α et de prostaglandine E2 chez les BV-2 (Zhou *et al.*, 2008). Ainsi, une meilleure régulation des canaux K^+ microgliaux pourrait réguler la production de ROS et de facteurs pro-inflammatoires et neurotoxiques de la microglie, lorsqu'elle est activée, tels que le TNF- α , la prostaglandine E2 et l'IL-1 β déclenchant ou exacerbant la neurodégénérescence (Block *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2005).

Choix des concentrations d'oxystérols et d'AGTLC utilisés

Des modifications des taux des dérivés oxydés du cholestérol (oxystérols) ont été rapportées chez des patients atteints des maladies dégénératives. Des taux élevés de 7KC et de 24S-OHC ont été mesurés chez les patients atteints de MA (Björkhem, 2006; Hascalovici *et al.*, 2009; Leoni *et al.*, 2013; Zarrouk *et al.*, 2014; Testa *et al.*, 2016), sclérose en plaques (Leoni *et al.*, 2002; Mukhopadhyay *et al.*, 2016; Crick *et al.*, 2016; Zhornitsky *et al.*, 2016), maladie de Parkinson (Doria *et al.*, 2016), X-ALD (Nury *et al.*, 2016), maladie de Huntington (Kreilaus *et al.*, 2016; Petrov *et al.*, 2016), maladie de Niemann-Pick (Porter *et al.*, 2010; Boenzi *et al.*, 2016; Romanello *et al.*, 2016). Les concentrations en 7KC et en 24S-OHC appliquées aux

158N et BV-2 ont été choisies en se référant aux travaux antérieurs menés au laboratoire, et par d'autres équipes. Nous avons utilisés à la fois des concentrations non toxiques (2,5 μM) et faiblement à moyennement toxiques (12,5 et 25 μM , respectivement). Ces concentrations peuvent sembler élevées mais elles sont atteintes sur plusieurs heures chez des sujets après des repas riches en lipides (**Morris et al., 2014**). Il est aussi important de préciser que seulement 20% des oxystérols introduits s'accumulent dans les cellules (**Corinne et al., 2009**). Par ailleurs, les concentrations plasmatiques, sont beaucoup plus faibles que les taux de lipides au niveaux cérébral.

L'accumulation plasmatique et tissulaire de C22:0, des AGTLC (C24:0 et C26:0) est, également, une caractéristique biochimique commune à de nombreuses maladies neurodégénératives comme les peroxysomopathies (en particulier l'X-ALD), la MA et la sclérose en plaques. Les cellules 158N et BV-2 ont été incubées en présence du C24:0, car ce dernier s'accumule fortement au niveau des régions corticales de patients Alzheimer au stade V et VI de la classification de Braak comparativement aux stage I et II (**Kou et al., 2011**). Le C24:0 a été utilisé à des concentrations de 1, 5, 10 et 20 μM : Cette gamme de concentration a été choisie en se référant aux concentrations plasmatiques de cet AGTLC identifiée chez les patients Alzheimer ($29,82 \pm 6,40 \mu\text{M}$) (**Zarrouk et al., 2015**). Cette gamme de concentrations utilisée est comparable à celles d'études préalablement réalisées sur cellules 158N et neuroblastomes SK-NB-E (**Kahn et al., 2011** ; **Zarrouk et al., 2012**).

Altération de l'homéostasie potassique

L'accumulation plasmatique et tissulaire d'oxystérols (**Leoni et al., 2002**; **Engelen et al., 2012**; **Mukhopadhyay et al., 2016**) et d'AGTLC est une caractéristique biochimique commune à de nombreuses maladies neurodégénératives (**Kou et al., 2011**; **Zarrouk et al., 2014**; **Senanayake et al., 2015**; **Nury et al., 2016**). On suppose qu'une meilleure prise en charge de ces différentes maladies passe par une meilleure compréhension des voies menant à la lipotoxicité et de leurs régulations. Par ailleurs, la physiopathologie de ces maladies reste peu connue, en particulier les relations entre l'accumulation d'AGTLC et de dérivés oxydés du cholestérol, l'oxydation, l'inflammation, la démyélinisation et la dégénérescence cellulaire. Actuellement, il est bien établi, sur de nombreux modèles, que le 7KC, le 24S-OHC et les AGTLC déclenchent une dégénérescence cellulaire associée à des altérations mitochondriales, peroxysomales et à un stress oxydatif (**Debbabi et al., 2016**; **Nury et al., 2017**). Actuellement, rien n'est connu sur l'impact du 7KC, du 24S-OHC et du C24:0 sur la $[\text{K}^+]_i$. Nos résultats montrent pour la première fois que le 7KC, le 24S-OHC et le C24:0 sont

capables d'induire une augmentation de $[K^+]_i$. Ceci a permis d'établir un lien entre la lipotoxicité et l'homéostasie du K^+ . En effet, aux regards de multiples critères de mortalité (désorganisation des phospholipides membranaires, dépolarisation de la membrane plasmique, dépolarisation mitochondriale, induction du stress oxydatif, perméabilité de la membrane plasmique à l'IP, activation de l'apoptose), nous avons montré que la rétention intracellulaire du K^+ est corrélé positivement avec la mort oligodendrocytaire et microgliale. Afin de déterminer la part prise par les Kv dans l'induction de la mort cellulaire, nous avons procédé à un blocage des canaux Kv avec la 4-AP, bloqueur universel des Kv. Lorsque la 4-AP est associé au 7KC et au 24S-OHC, la viabilité cellulaire est faiblement augmentée. En revanche, l'association de 4-AP avec le C24:0 amplifie fortement la perte de viabilité. Ceci suggère que les canaux Kv sont différemment mobilisées par les oxystérols et le C24:0.

Ordre d'assemblage des phospholipides de la membrane plasmique

L'ordre d'arrangement des phospholipides membranaires a été mesuré par un fluorochrome hydrophobe, la MC540. La MC540 agit en détectant une diminution de l'ordre d'assemblage des phospholipides dans le feuillet externe de la bicouche lipidique de la membrane plasmique (**Williamson et al., 1983; Langner et Hui, 1993**). L'intensité de fluorescence émise par ce fluorochrome est modifiée selon le degré de désordre lipidique présent dans la membrane plasmique (**Harrison et al., 1996; Harrison et Gadella, 2005**). Nos résultats ont montré que l'application du 7KC, 24S-OHC ou C24:0 réduit de manière dose et temps dépendante l'ordre d'assemblage des phospholipides dans le feuillet externe de la bicouche lipidique de la membrane plasmique. L'effet du 7KC sur la membrane des 158N est en accord avec celui observé sur les cellules U937 (**Vejux et al., 2009**). Par analogie avec les résultats obtenues sur U937 traitées avec le 7KC, il est suggéré que le 7KC et le 24S-OHC pourraient également inactiver les voies métaboliques, PI3-K / PDK-1 / Akt, associées à la face interne de la membrane plasmique et impliquées dans la régulation de viabilité cellulaire (**Datta et al., 1999; Vejux et al., 2009**). L'activation de la voie PI3-K / PDK-1 / Akt pourrait aussi être responsable de l'accumulation intracellulaire du K^+ via l'inactivation des Kv à rectification retardée (**Wu et al., 2015**).

De plus, il a été suggéré qu'en fonction de la position du substituant oxygéné, les oxystérols se positionnent différemment au sein de la membrane plasmique induisant ainsi des effets distincts sur l'ordre et la fluidité de la bicouche lipidique. Lorsque l'hydroxyl est localisé sur la chaîne latérale des oxystérols, ces derniers possèdent des groupes polaires sur les deux

extrémités, ce qui favorise une orientation horizontale à la surface de la membrane. Par contre, les oxystérols ayant leur substitution oxygénée au niveau du noyau stérol, ont tendance à adopter une orientation inclinée en positionnant les deux fonctions polaires près de l'interface (**Oikkonen et al., 2009**). Nos résultats ont montré une désorganisation membranaire légèrement plus importante en présence de 24S-OHC qu'en présence du 7KC ce qui suggère soit que le 24S-OHC s'incorpore plus entre les phospholipides membranaires que le 7KC, soit qu'à incorporation identique il désorganise plus les phospholipides, cette hypothèse semble plus probable sur la base des travaux de **Oikkonen et al. (2009)**. Comme attendu en raison de la structure des acides gras, la désorganisation de la membrane cytoplasmique mesurée avec C24:0 est bien moins importante que celles mesurée avec le 7KC et le 24S-OHC.

L'accumulation du 7KC, 24S-OHC et de C24:0 peut engendrer des modifications des caractéristiques lipidiques membranaires pouvant mener à une délocalisation des protéines membranaires connectées ou non au cytosquelette ce qui pourrait affecter l'adhésion cellulaire, la signalisation cellulaire et en particulier le transport ionique. En raison de ces observations, nous avons cherché à savoir si les changements de la structure membranaire par le 7KC, le 24S-OHC et le C24:0 pouvaient s'accompagner de modifications de la polarité membranaire.

Variations du potentiel électrochimique de la membrane plasmique

Les variations du potentiel électrochimique de la membrane plasmique sous l'effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0 ont été mesurées à l'aide d'une sonde fluorescence, le DiBAC2(3). Le DiBAC2(3) a été sélectionné en raison de sa charge anionique, la sonde traverse la membrane plasmique lorsque celle-ci est dépolarisée et s'associe aux protéines et lipides de la membrane, conduisant à une augmentation de la fluorescence (**Willmott et al., 2000**). Grâce à sa charge négative élevée, le DiBAC2(3) est exclu des mitochondries et constitue donc une sonde sélective pour le potentiel électrochimique de la membrane plasmique. L'étude du potentiel membranaire par la sonde DiBAC2(3) prouve que l'exposition des oligodendrocytes 158N au 7KC et au 24S-OHC conduit à une dépolarisation de la membrane plasmique. La dépolarisation membranaire induite par le 7KC atteint un plateau alors qu'avec le 24S-OHC elle continue d'augmenter. Le C24:0, quant à lui, n'induit qu'une légère dépolarisation membranaire.

En raison de la désorganisation des phospholipides membranaires sous l'action du 7KC, du 24S-OHC et dans une moindre mesure avec le C24:0, la dépolarisation plus ou moins marquée de la membrane plasmique pourraient être expliquée par une activation et/ou une désactivation de nombreux récepteurs et transporteurs ioniques. L'impact essentiellement des oxystérols sur l'homéostasie ionique et l'expression et l'activité des canaux ioniques (en particulier ceux impliqués dans la neurotransmission (Na^+ et K^+)) n'est pas encore claire même si certains oxystérols sont considérés comme des molécules modulatrices, en particulier des canaux Ca^{2+} (**Kondratskyi et al., 2015**). Cependant, peu de choses sont connues à-propos de l'impact des oxystérols et de C24:0 sur l'homéostasie d'autres ions comme le K^+ , le Na^+ et les ions chlorures (Cl^-).

En plus des canaux Ca^{2+} d'autres ions et canaux ioniques peuvent être affectés par les oxystérols et les AGTLC. Par exemple, dans les conditions physiologiques 50% d'ATP cellulaire est consommé pour assurer l'activité de la pompe Na^+ / K^+ ATPase (**Howarth et al., 2012**). Une baisse de la concentration intracellulaire d'ATP réduit l'activité de la pompe Na^+ / K^+ ATPase et pourrait être responsable de la dépolarisation de la membrane plasmique. En faveur de cette hypothèse, dans les cellules endothéliales humaines, le 7KC réduit la synthèse d'ATP et l'expression de la sous unité α de la pompe Na^+ / K^+ ATPase (**Duran et al., 2010; Leoni et al., 2017**). Il est également possible que la dépolarisation membranaire observée en présence de ces composés pourrait résulter de l'activation du récepteur NMDA. Dans ce contexte, il est déjà démontré que 24S-OHC active le récepteur NMDA (**Paul et al., 2013**). Une hyperactivité du récepteur NMDA a aussi été associée à la MA (**Lipton et al., 2007**). Pour tenter d'expliquer la dépolarisation ainsi observée en présence du 7KC, du 24S-OHC et du C24:0, nous avons ciblé le K^+ .

Variations du taux de K^+ libre dans les cellules 158N et BV-2 en réponse aux traitements par le 7KC, 24S-OHC et C24:0

Le K^+ est l'ion prédominant à l'intérieur de la cellule (~ 140 mM), les concentrations intracellulaires de Na^+ , Ca^{2+} et Cl^- sont de plusieurs ordres de grandeur inférieur au K^+ . Par conséquent, $[\text{K}^+]_i$ est le principal déterminant du maintien de l'homéostasie intracellulaire. La modulation des canaux et des pores ioniques est une étape essentielle pendant la mort cellulaire par apoptose, nécrose et autres formes de mort cellulaire indépendante de caspases (**Kunzelmann, 2016**). Néanmoins, le rôle précis de la $[\text{K}^+]_i$ pendant la mort cellulaire est loin d'être compris. Ainsi, une étude approfondie de la contribution de l'homéostasie potassique

dans la lipotoxicité des oxystérols et des AG majoritairement associés aux maladies neurodégénératives est nécessaire car elle pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour s'opposer à la neurodégénérescence.

Dans ce travail, nous avons considéré que l'homéostasie potassique pouvait être altérée sous l'effet du 7KC, du 24S-OHC et du C24:0 et de fait contribuer à la neurodégénérescence. Sur des cellules 158N, la teneur intracellulaire en K^+ a été déterminée par deux approches ; une approche ratiométrique avec le PBFI-AM et une approche automatisée; la photométrie à flamme. Nos résultats ont montré que le 7KC, le 24S-OHC et le C24:0 augmentent la $[K^+]_i$. Cependant, les $[K^+]_i$ détectée par la technique automatisée (photométrie à flamme) sont plus élevés que ceux mesurés par fluorimétrie avec la sonde ratiométrique PBFI-AM. Ceci peut être expliqué par différentes raisons. En effet, avec PBFI-AM, nous n'avons pris en considération que les cellules adhérentes (cellules vivantes), les cellules mortes ou mourantes ont été éliminées. Nous pouvons donc supposer que l'importante accumulation intracellulaire de K^+ survient plutôt tardivement dans la mort cellulaire. Cette différence peut aussi être expliquée par une sensibilité plus importante de la photométrie à flamme. Avec les BV-2, la mesure du $[K^+]_i$ n'a été effectuée que par photométrie à flamme car les cellules sont peu adhérentes. Sur les cellules BV-2, le 7KC, le 24S-OHC et le C24:0 n'induisent qu'une faible augmentation, cependant significative, de la $[K^+]_i$ à 24 h : cet effet n'est plus observé à 48 h. Sur cellules BV-2, contrairement aux cellules 158N, la faible augmentation de la $[K^+]_i$ suggère une lipotoxicité indépendante du K^+ bien qu'une implication transitoire de cet ion dans la mort cellulaire des cellules microgliales ne puisse être exclue..

En faveur de ces observations, plusieurs travaux supportent l'hypothèse que les troubles neurodégénératifs tels que la MA, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la Sclérose en plaques (SEP) et la sclérose latérale amyotrophique sont caractérisés par des transmissions ioniques défectueuses. Cependant, les molécules impliquées et les mécanismes associés ne sont pas encore élucidés et sont encore mal compris (**Kumar et al., 2016**). Des études post mortem ont signalé une augmentation des taux de K^+ chez des patients atteints de MA au niveau périphérique et centrale (**Vitvitsky et al., 2012; Roberts et al., 2016**). Les $[K^+]_i$ mesurés sont positivement corrélées aux charges amyloïdes et au pH du tissu frontal (**Graham et al., 2015**). Etant donné que la pathophysiologie sous-jacente aux maladies neurodégénératives est complexe, il est encore, difficile de savoir dans quelle mesure les anomalies liées aux canaux K^+ reflètent un mécanisme pathogène spécifique au développement et à la progression de ces maladies à savoir: dépression et troubles de l'humeur, manies, stress, MA, SEP, maladie de Parkinson, X-ALD, troubles de l'apprentissage

et de la mémoire, hyperexcitabilité neuronale et épilepsie (de Lores Arnaiz *et al.*, 2017). Pour l'X-ALD, il pourrait être intéressant de déterminer si la rétention intracellulaire de K^+ pourrait augmenter la cytotoxicité de l'accumulation des AGTLC et favoriser la conversion de la forme inflammatoire cérébrale et démyélinisante (Childhood Cerebral ALD : CCALD) à sa forme non inflammatoire cérébrale démyélinisante souvent fatale (Adolescent or Adult Cerebral ALD : ACALD). En effet, les événements capables de déclencher la conversion de la CCALD en ACALD sont encore inconnus et leur identification est cruciale pour mieux comprendre la progression de la maladie (Engelen *et al.*, 2014). L'implication des voies K^+ dépendantes dans l'X-ALD a été également soulignée en présence du 25-OHC. Le 25-OHC stimule, via le purinorécepteur P2X7, un efflux de K^+ nécessaire pour l'assemblage et l'activation du complexe NLRP3 (Jang *et al.*, 2016). Des mécanismes similaires, liés à 25-OHC et 7KC, ne peuvent pas être exclus dans le cadre de la SEP et de la DMLA (Olivier *et al.*, 2016; Crick *et al.*, 2016). L'activation de P2X7 a été également observée chez les patients atteints de la MA (Sanz *et al.*, 2009), la maladie de Huntington (Diaz Hernandez *et al.*, 2009), les douleurs neuropathiques (Broom *et al.*, 2008) et les lésions de la moelle épinière (Cotrina *et al.*, 2009). En plus de P2X7, le 7KC est capable de réduire l'activité du canal KATP des cellules endothéliales humaines (Duran *et al.*, 2010). La modulation de ce dernier a été observée pendant le vieillissement, la dépression, les troubles de mémoire et d'apprentissage, la MA, l'hyperexcitabilité et l'épilepsie (de Lores Arnaiz *et al.*, 2017). En outre, le 24S-OHC, le principal métabolite du cholestérol au niveau cérébral, a été décrit comme un puissant activateur hautement sélectif du NMDAR (Paul *et al.*, 2013). L'altération de ce récepteur est impliquée dans plusieurs troubles neuropsychiatriques associés à des déficits cognitifs, tels que la schizophrénie, la dépression, la MA et l'épilepsie (Li *et al.*, 2009; Zorumski *et al.*, 2012).

Contribution de la $[K^+]_i$ à la lipotoxicité du 7KC, du 24S-OHC et du C24:0 dans les cellules 158N et BV-2

Notons que le 7KC et le 24S-OHC induisent un mode particulier de mort cellulaire impliquant simultanément l'oxydation, l'apoptose et l'autophagie, nommé oxiaoptophagie (Nury *et al.*, 2015). Par ailleurs, les AG (C22:0, C24:0 et C26:0) induisent une mort cellulaire non apoptotique et évoquant une forme de mort cellulaire associée à l'autophagie et au stress oxydatif (Baarine *et al.*, 2012; Zarrouk *et al.*, 2012). Dans l'oxiaoptophagie, l'accumulation de $[K^+]_i$ est importante. En revanche, dans la mort induite par le C24:0

l'accumulation de $[K^+]_i$ est faible. Comme l'oxiaptophagie est associée à du stress oxydant et à des dysfonctionnements mitochondriaux (également induits par le C24:0) il était donc important d'étudier les corrélations entre les variations de la $[K^+]_i$ induites par le 7KC, le 24S-OHC et le C24:0, la dépolarisation mitochondriale, la surproduction de $O_2^{\bullet-}$ et la perméabilité à l'IP. Nos résultats ont révélé une corrélation positive entre la $[K^+]_i$ et le pourcentage de cellules DiOC₆(3) négatives, HE positives et IP positives avec les 158N et les BV-2.

La surcharge en ROS caractérise les maladies neurodégénératives liées à l'âge telles que la MA, la maladie de Parkinson, la SEP ou encore la DMLA (Sies *et al.*, 1997; Polidori *et al.*, 2001; Whitehead *et al.*, 1995; Haleng *et al.*, 2007; Esposito *et al.*, 2002; Aliev *et al.*, 2008). Chez les patients Alzheimer, les ROS sont élevés au niveau de régions cérébrales présentant des altérations histopathologiques sévères ; leurs niveaux corrélerent bien avec la gravité des symptômes associés à la MA (Rao *et al.*, 2002; Hardy *et al.*, 2002; Mattson *et al.*, 2014). L'oxydation des protéines a été observée de façon très marquée au niveau des régions cérébrales présentant des altérations histopathologiques sévères. Plus particulièrement, les canaux K^+ soient vulnérables à l'attaque radicalaire (Cai *et al.*, 2009; Sesti, 2016). La modulation de l'expression ou de l'activité de nombreux types de canaux K^+ , à savoir les Kv (Liu *et al.*, 2002; Pal *et al.*, 2003), les canaux à deux domaines P (Duprat *et al.*, 2005), les canaux KCa (Tang *et al.*, 2004) et les canaux K^+ à rectification entrante couplés à la protéine G (Zeidner *et al.*, 2001) par les ROS a été rapportée. En effet, les ROS peuvent induire des modifications structurales et/ou fonctionnelles des canaux K^+ et agissent de plus comme des molécules de signalisation intervenant dans de nombreuses voies physiologiques (Droge, 2002; Forman *et al.*, 2010; Maher, 2006; Veal *et al.*, 2011). Par exemple, sous l'effet des ROS des formes oligomérisés de Kv2.1 ont été détectées sous forme d'oligomères dans le cerveau des souris âgées et en quantité plus importantes dans le cerveau du modèle transgénique de la MA (souris 3x-Tg-AD) (Oddo *et al.*, 2003; Cotella *et al.*, 2012). L'activité du canal KCa est plus élevée dans les neurones soumis à un stress oxydatif élevé, dans le cerveau de souris TgCRND8, modèle de la MA, ainsi qu'en cas d'ischémie (Gong *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2010). Cependant, la signification physiologique des interactions des ROS avec les canaux K^+ n'est pas encore résolue, à l'exception de quelques études qui ont suggéré un rôle potentiel de l'oxydation des canaux K^+ dans l'hypoxie neuronale (Avshalumov *et al.*, 2003; Gamper *et al.*, 2006). Comme, le 7KC, le 24S-OHC et le C24:0, sont capables de déclencher un stress oxydatif dans les cellules 158N et BV-2, ceci suppose que ces composés pourraient affecter l'activité des canaux K^+ et expliquer la rétention du K^+ par des modifications post-transcriptionnelles liées au stress oxydant. Le 7KC et le 24S-OHC

induisent une mort cellulaire du type apoptotique chez les 158N évaluée par la présence d'un pic Sub-G1, de cellules à noyaux fragmentés et/ou condensés, de fragmentation internucléosomale de l'ADN, d'une activation de la caspase-3 conduisant à un clivage de PARP. Le 7KC et le 24S-OHC sont également capables d'induire l'autophagie mise en évidence par l'activation de LC3-I en LC3-II.

Quant au C24:0, il induit un type de mort cellulaire non apoptotique cellulaire indépendant des caspases.

La présence de nombreuses vacuoles intracellulaires observées dans des SK-NB-E traitées par des AGTLC attribue la mort cellulaire induite par les AGTLC à de l'autophagie. Par ailleurs, les dysfonctionnements des canaux K^+ ont été associés à l'apoptose et à l'autophagie ce qui pourrait expliquer la rétention du K^+ induite par le 7KC et le 24S-OHC. Il a été décrit que, le maintien de la concentration physiologique en K^+ supprime l'activation des caspases, des nucléases et la formation de l'apoptosome (Hughes *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2003). L'inhibition du courant IA (courants potassiques transitoires) et IK_{DR} (courants potassiques à rectification retardée) entraîne l'accumulation cytoplasmique de K^+ en raison de la diminution de l'efflux K^+ , ce qui conduit à l'hyperexcitabilité et à la mort cellulaire (Pannicke *et al.*, 2004).

Dans le contexte de la MA, la neurotoxicité de l' $A\beta_{25-35}$ est médiée par une atténuation des courant IA et IK_{DR} (Yin *et al.*, 2017). Les même canaux peuvent stimuler l'apoptose dans certains types de cellules, mais activer la prolifération cellulaire dans d'autres lignées ; le même stimulus pourrait à la fois induire un efflux ou un influx de K^+ selon la concentration (Lang *et al.*, 2012). Dans certaines lignées cellulaires, il a été démontré que l'inhibition des canaux K^+ (Bankers *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 1997; Hebert *et al.*, 2004, Miki *et al.*, 1997, Pal *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2004) favorise l'apoptose et que leur activation bloque l'activation des caspases (Jakob *et al.*, 1997; Lauritzen *et al.*, 1997). Dans d'autres types de cellules, l'apoptose est favorisée par l'activation des canaux K^+ (Wei *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 1997) et inhibée par l'inhibition de l'efflux de K^+ cellulaire par augmentation de la concentration extracellulaire du K^+ (Colom *et al.*, 1998; Lang *et al.*, 2003, Prehn *et al.*, 1997) ou par blocage des canaux K^+ (Gantner *et al.*, 1995; Lang *et al.*, 2003).

Des preuves récentes ont reliées l'homéostasie potassique à la voie autophagique (Sahni *et al.*, 2017). En fait, une étude récente a montré que la stimulation pharmacologique du gène 3 hERG3 (human erythroblast transformation-specific related gene 3), canal K^+ localisé au niveau de la membrane plasmatique, induit l'autophagie dans les cellules de mélanome via l'activation de la voie de signalisation AMPK-dépendante (AMP-activated protein kinase-dépendante) (Perez *et al.*, 2016). Des études antérieures ont également montré que la

privation en K^+ peut induire l'autophagie dans les cellules granuleuses du cervelet (**Canu et al., 2005; Kaasik et al., 2005**). Une autre épreuve en faveur du lien entre le K^+ et l'autophagie est démontrée en prenant en considération l'éventuelle modulation des Kv par la protéine P62 (protéine impliquée dans la voie de l'autophagie) (**Hamacher et al., 2012**).

Les canaux de K^+ ancrés dans la membrane plasmique contribuent de manière importante au maintien de l'homéostasie ionique intracellulaire. Cependant, l'intervention des canaux K^+ localisés au niveau des membranes des organites cellulaires n'est pas à exclure. D'un autre côté, la cytotoxicité des oxystérols ainsi que celle des AGTLC fait intervenir la mitochondrie, le peroxysome et le lysosome (contribuant à l'autophagie).

L'accumulation du 7KC, 24S-OHC et C24:0 provoque une chute du $\Delta\psi$ mitochondrial ($\Delta\psi_m$) mesurée par coloration au DiOC6(3) chez les 158N et les BV-2. L'augmentation de la perméabilité mitochondriale (dépoliarisation mitochondriale) est une des étapes clés dans l'exécution de la mort cellulaire quel que soit le type et l'origine des cellules considérées (**Hein et al., 2008; Baarine et al., 2012**). Les mitochondries ont quant à elles un potentiel de repos contrôlé par la très grande résistance de leurs membranes internes, c'est à dire leur faible perméabilité aux ions. Bien que la membrane interne mitochondriale possède de multiples canaux ioniques, leur ouverture est très finement régulée afin d'empêcher la dissipation du potentiel de membrane. En effet, le maintien de cette faible perméabilité ionique contrôle l'activité de la chaîne de phosphorylation oxydative et assure la synthèse d'ATP. Malgré l'équilibre en K^+ entre le cytoplasme et la mitochondrie, le gradient électrique assure l'entrée du K^+ dans la matrice mitochondriale via les canaux K^+ placés au niveau de la membrane mitochondriale interne (**Szabo et al., 2014**). Jusqu'à présent, il existe huit canaux K^+ connus pour assurer la perméabilité de la membrane mitochondriale interne au K^+ et la régulation du $\Delta\psi_m$: KATP, SK, BK, Kv1.3, Kv7.4, TASK-3 et SLO2 (**Inoue et al., 1991; Szabo et al., 2005; De Marchi et al., 2009; Singh et al., 2012; Dolga et al., 2013; Laskowski et al., 2017**). Les K^+ mitochondriaux règlent aussi le volume mitochondrial, le transport du Ca^{2+} et la synthèse des ROS (**Checchetto et al., 2016**). Ces canaux règlent entre autre l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Cardoso et al., 2010**). Ainsi, l'altération des canaux K^+ mitochondriaux pourrait expliquer l'augmentation des taux du lactate et la baisse de ceux du pyruvate, citrate, fumarate, succinate (intermédiaires du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA)) révélées chez les 158N en présence du 7KC (**Leoni et al., 2017**). De plus, des différences de l'expression protéique de la sous-unité Core 2 du Complexe III et de la sous-unité II du Complexe IV de la chaîne respiratoire ont été observées suite aux traitements des SK-NB-E avec le C24:0 (**Zarrouk et al., 2012**). Cette modulation du

niveau d'expression des sous unité du complexe de la chaîne respiratoire ne reflète pas forcément une perturbation de l'activité des enzymes du cycle TCA. L'effet du 24S-OHC sur l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial n'est pas encore abordé. Ces perturbations des activités des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial confortent l'hypothèse de l'altération de l'activité des canaux K^+ mitochondriaux sous l'effet des oxystérols et des AGTLC cytotoxiques. Par conséquent, le transport du K^+ à travers les canaux K^+ mitochondriaux doit être étroitement contrôlé pour préserver l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale et la réduction de la synthèse de l'ATP.

Comme le peroxyosome est impliqué dans la lipotoxicité des oxystérols et des AGTLC, l'impact de la $[K^+]_i$ sur l'expression et l'activité des enzymes peroxysomales assurant la β -oxydation des AGTLC, l' α -oxydation de l'acide phytanique, la synthèse du DHA et des plasmalogènes, la dégradation du H_2O_2 via la catalase ainsi que la synthèse de NO par la NO synthase mérite d'être étudiée (Marcus *et al.*, 1998; Goodenowe *et al.*, 2007; Manivannan *et al.*, 2012; López-Erauskin *et al.*, 2013; Trompier *et al.*, 2014). Il est déjà établi sur 158N et BV-2 que le 7KC induit plusieurs altérations peroxysomales: réduit le niveau d'Abcd1, Abcd2, Abcd3, Acox1 et / ou Mfp2 et l'activité de la catalase et d'Acox1 (Baarine *et al.*, 2012; Nury *et al.*, 2017). La rétention de K^+ pourrait altérer le peroxyosome et par conséquent amplifier l'accumulation des AGTLC (C24:0, C26:0), la rupture de l'équilibre RedOx, la peroxydation des lipides, la carbonylation des protéines aboutissant subséquentement à des effets inflammatoires, une autophagie excessive et délétère dont l'ensemble conduirait à la mort cellulaire. Pour préciser cette hypothèse, une étude complémentaire des relations entre le peroxyosome et la $[K^+]_i$ doit être abordée.

Au regard de ces résultats associant la régulation du flux de K^+ cellulaire, la dépolarisation mitochondriale, la production des ROS et la mort cellulaire, une augmentation de la $[K^+]_i$ sous l'effet de 7KC, de 24S-OHC et de C24:0 pourrait accentuer leur cytotoxicité et favoriser le développement de maladies neurodégénératives.

Implication des Kv dans la lipotoxicité de 7KC, 24S-OHC et C24:0

Les canaux ioniques jouent un rôle essentiel dans l'activation et la transmission du potentiel d'action ainsi que dans le maintien du potentiel membranaire dans le SNC. Les canaux ioniques sont ciblés pour le traitement des maladies neurodégénératives. Les Kv sont

largement exprimés dans le SNC et périphérique. Il est important de noter que ces canaux participent activement aux voies de signalisation cellulaire qui régulent la viabilité cellulaire, la libération d'hormones, de neurotransmetteurs et la plasticité synaptique (**Meir et al., 1999; Muller et al., 2002 ; Shah et al., 2014**). La dégénérescence cellulaire est une étape critique des troubles neurologiques observés dans les maladies neurodégénératives. Par conséquent, la compréhension des mécanismes et des voies de signalisation aboutissant à la lipotoxicité des oxystérols et des AGTLC est primordiale pour développer avec succès des stratégies thérapeutiques, prévenir ou réduire les dommages neuronaux. En revanche, à ce jour, aucune donnée n'est disponible sur une éventuelle association entre la modulation de l'activité et/ou de l'expression des Kv et la lipotoxicité d'oxystérols et des AGTLC. Pour cette étude, nous avons supposé qu'une modulation de l'activité et ou de la localisation des Kv par les AGTLC et les oxystérols pourrait expliquer l'accumulation intracellulaire de K^+ et l'induction de la mort cellulaire.

Les radeaux lipidiques (« rafts »), constitués principalement de sphingomyélines et de cholestérol (**Simons et al., 1997; Alonso et al., 2001**), ont émergé comme des plates-formes spécifiques des canaux ioniques comme les Kv, les canaux K^+ - Ca^{2+} dépendant (BK), les canaux K^+ à rectification retardée (Kir), les canaux Na^+ voltage dépendant, canaux Ca^{2+} de type L, canaux cationiques contrôlés par les nucléotides cycliques (HCN), canaux à potentiel de récepteur transitoire (TRP), canaux chlorure et les purinorécepteurs P2X (**Dart, 2010**). Ainsi, une désorganisation de ce microdomaine membranaire sous l'effet des AGTLC et / ou des oxystérols pourrait délocaliser l'ensemble de ces canaux associées. Nous nous sommes alors posé la question : le 7-KC, 24S-OHC et C24:0 induisent-ils désorganisation des rafts?

Nos résultats ont montré en utilisant la MC 540 que le 7KC, le 24S-OHC et le C24:0 désorganisent l'arrangement des phospholipides membranaire. La MC540 donne des informations sur la fluidité membranaire : si les phospholipides membranaires sont bien organisés, alors l'accumulation de MC540 dans la membrane cytoplasmique est faible ; en revanche, si les lipides membranaires sont désorganisés alors l'accumulation de MC540 dans la membrane cytoplasmique est forte (**McEvoy et al., 1988**). L'utilisation de la MC540 ne nous renseigne que sur la fluidité de la membrane plasmique. Des travaux antérieurs menés par notre équipe sur des cellules 158N ont montré que le 7KC affecte l'organisation des radeaux lipidiques et s'accumule dans ces derniers (**Kahn et al., 2011 ; Ragot et al., 2013**) alors que les AGTLC altèrent la fluidité membranaire sans affecter les microdomaines (**Baarine et al., 2012**). Aussi, nous avons cherché à déterminer les conséquences de l'inactivation des Kv sur l'induction de la mort cellulaire en présence de 7KC, 24S-OHC et

C24:0. L'utilisation de la 4-AP, bloqueur universel des Kv, exacerbe peu la lipotoxicité du 7KC et du 24S-OHC et fortement celle du C24:0. Le blocage des Kv amplifie la perte de viabilité cellulaire évaluée par la dépolarisation mitochondriale, la perte de l'intégrité de la membrane cytoplasmique, la condensation/fragmentation de l'ADN (évaluée par l'apparition d'un pic SubG1), l'activation de la caspase-3 et le clivage de PARP. Les effets les plus marqués ont été observés suite aux associations de la 4-AP avec le C24:0. Pour le 24S-OHC, les effets de la 4-AP sont peu marqués. Ceci peut s'expliquer par la capacité du 24S-OHC à induire une désorganisation des phospholipides membranaires, une dépolarisation de la membrane cytoplasmique et une accumulation du K^+ plus importante que celles observées en présence de 7KC et de C24:0. Par ailleurs, l'impact initial de ces différents lipides sur les Kv et sur les voies intervenant dans le contrôle de leur activation et désactivation ne sont pas encore abordés. Il semble que le 24S-OHC et à un degré moins important le 7KC inhibent les Kv. L'impact de C24:0 sur les Kv paraît être faible ; la rétention de K^+ observé en présence de C24:0 impliquerait d'autres canaux K^+ que les Kv.

Dans l'ensemble, nos données supportent l'hypothèse selon laquelle l'inhibition des canaux Kv conduirait à une augmentation de $[K^+]_i$ et contribuerait à la cytotoxicité du 7KC, 24S-OHC et à moindre degré à celle de C24:0. Ainsi, il pourrait être intéressant de déterminer chez les patients atteints de maladies neurodégénératives démyélinisantes ou non démyélinisantes associées à des niveaux élevés d'oxystérols cytotoxique et / ou des altérations de métabolisme lipidique peroxysomal (conduisant à une accumulation d'AGTLC) si l'utilisation de modulateurs des Kv pourrait ralentir la progression de la dégénérescence cellulaire.

Effets du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur Kv3.1b

Pour une meilleure évaluation de l'altération des Kv lors du processus de dégénérescence oligodendrocytaire et microgliale médiée par le 7KC, le 24S-OHC et C24:0, nous avons choisi d'exploiter le canal Kv3.1, plus précisément Kv3.1b. Ce canal a été sélectionné en se référant au fait qu'il est largement exprimés au niveau des compartiments cérébraux impliqués dans le contrôle des activités dérégulées chez les patients atteints de maladies neurodégénératives comme l'activité motrice, la régulation du sommeil et de l'humeur (**Rudy et al., 2001; Espinosa et al., 2004; Joho et al., 2006**). Dans le contexte de la MA, les taux d'ARNm et de protéines Kv3.1 étaient significativement plus faibles chez les souris APPPS1, souris transgéniques modèle de la MA, suggérant qu'une diminution des courants Kv3.1 pourrait jouer un rôle dans la MA (**Boda et al., 2012**). De plus, la mutation de preseniline 1

induit la rétention du Kv3.1 dans le milieu intracellulaire et réduit son trafic et son insertion dans la membrane cellulaire (Plant *et al.*, 2012). Shakkottai *et al.* (2011) ont également montré que l'ataxine-3, protéine spécifique de la maladie neurodégénérative Ataxie de type 3, inactive Kv3.1 (Shakkottai *et al.*, 2011). D'autres études ont montré que l'expression des sous-unités Kv3.1 était réduite dans différents modèles de douleurs neuropathiques (Gu *et al.*, 2012; Ishikawa *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2013).

Pour aborder *in vitro* l'éventuelle modulation de Kv3.1 en condition de lipotoxicité, il était nécessaire de disposer des modèles cellulaires appropriés (exprimant Kv3.1). En effet, l'expression de Kv3.1 a été bien caractérisée dans différents types neuronaux, y compris les cellules granulaires cérébelleuses, la substantia nigra reticulata, les noyaux thalamiques, le colliculus inférieur, les noyaux cochléaires, etc (Rudy *et al.*, 1992; Weiser *et al.*, 1995; Perney *et al.*, 1997; Ozaita *et al.*, 2002; Devaux *et al.*, 2003). La présence de Kv3.1 chez les oligodendrocytes a été décrite par Woodruff *et al.*, (2006). Kv3.1 joue un rôle structural et fonctionnel chez les oligodendrocytes, une importante démyélinisation a été observée chez les souris Kv3.1-knock-out (Kv3.1 - / -) (Woodruff *et al.*, 2006). En outre, une réduction significative de l'efflux de K^+ a été mesurée suite au blocage de Kv3.1 (Woodruff *et al.*, 2006). Ainsi, on suspecte une implication déterminante de Kv3.1 dans le maintien de la structure et des fonctions oligodendrocytaires en condition du stress. La microglie humaine exprime entre autre le canal Kv3.1 ; dans le contexte de la MA, ce canal a été sélectionné pour réduire l'activation du courant K_{DR} induit par le peptide amyloïdes (Franciosi *et al.*, 2006).

En continuité avec notre étude *in vitro*, nous avons choisie d'évaluer la contribution de Kv3.1 à la lipotoxicité du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur les cellules 158N et BV-2. Nous avons ainsi identifié, pour la première fois, l'expression de Kv3.1 par les oligodendrocytes murins (158N) et les cellules microgliales BV-2 par immunofluorescence associée à la cytométrie en flux et à la microscopie à fluorescence conventionnelle, et par western blot. Les différentes techniques utilisées montrent que les 158N et les BV-2 expriment Kv3.1.

L'expression de ce canal par les cellules 158N et par les cellules microgliales BV-2 constitue un outil intéressant pour comprendre l'impact de différentes molécules comme les oxystérols et les AGTLC sur le maintien de l'homéostasie potassique intracellulaire dans le cadre de différentes maladies neurodégénératives.

Kv3.1 donne lieu à deux isoformes par un épissage alternatif, qui se produit exclusivement dans la région C-terminale; les 18 derniers acides aminés du côté C-terminal de la forme Kv3.1a sont substitués par 84 acides aminés pour la forme Kv3.1b (Luneau *et al.*, 1991). Kv3.1b est localisé principalement dans les dendrites proximaux, le soma et les axones

(Weiser *et al.*, 1995; Sekirnjak *et al.*, 1997; Ozaita *et al.*, 2002). Kv3.1a est moins abondant que Kv3.1b et sera remplacé progressivement par Kv3.1b à l'âge adulte (Perney *et al.*, 1992; Gan *et al.*, 1998). Pour cette raison, l'étude des effets du 7KC, 24S-OHC et C24:0 a été mise en œuvre sur l'isoforme Kv3.1b.

L'analyse du niveau d'expression de Kv3.1b sur les 158N et les BV-2 en présence du 7KC, 24S-OHC et C24:0 a été effectuée par cytométrie en flux. Les 158N ont montré des niveaux d'expression plus marqués de Kv3.1b avec 7KC et 24S-OHC. Une légère induction de Kv3.1b a été observée en présence d'éthanol. Une hypersensibilité à l'éthanol a été détectée chez les souris double homozygotes Kv3.1 / Kv3.3 (Espinosa *et al.*, 2001). Le traitement avec du C24:0 ne module pas le niveau d'expression de Kv3.1b. Dans les mêmes conditions, aucune modulation significative de l'expression de Kv3.1b n'a été observée sur les cellules BV-2 en présence du 7KC, 24S-OHC et C24:0 pendant 24 h d'incubation. Il a fallu 48 h pour induire une surexpression significative de Kv3.1b avec le 7KC et le 24S-OHC et le C24:0. Les expériences menées montrent une variabilité des effets de 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur l'induction de l'expression du Kv3.1b, cette différence est bien marquée entre les cellules oligodendrocytaires et microgliales.

La contribution de Kv3.1b à la mort cellulaire induite par les oxystérols ou C24:0 lipotoxiques est donc un phénomène complexe, qui dépend du type cellulaire et de l'environnement lipidique. Ainsi, l'étude de corrélation entre le niveau d'expression de Kv3.1b (obtenu en présence de 7KC, 24S-OHC et C24:0), la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial, la surproduction de $O_2^{\bullet-}$ et la perméabilité à l'IP sur les cellules 158N et BV-2 ont montré des corrélations positives. Les cellules 158N traitées avec 7KC et 24S-OHC ont montré une corrélation positive entre les différents paramètres analysés, et aucune corrélation avec le C24:0. Par ailleurs, les cellules BV-2 ont montré une corrélation positive entre le niveau d'expression de Kv3.1b et le pourcentage des cellules avec mitochondries dépolarisées après 24 h de traitement avec le 7KC, 24S-OHC et C24:0 et ce en absence de toutes modulations significatives de l'expression du Kv3.1b. Comme l'expression de Kv3.1b est positivement corrélée avec plusieurs paramètres avec plusieurs paramètres associés à la mort cellulaire, ces résultats suggère une implication probable de Kv3.1b dans la lipotoxicité.

Au regard des résultats montrant une rétention intracellulaire de K^+ sous l'effet de 7KC, 24S-OHC et C24:0, et du fait que Kv3.1b code pour le courant K_{DR} , nous avons voulu déterminer l'impact de ces lipides sur la conductibilité de ce canal. Les mesures du courant

caractéristique de Kv3.1 exprimé dans les ovocytes de xénopes par la technique de voltage clamp en doubles microélectrodes intracellulaires ont été entreprises en présence de 7KC et 24S-OHC. L'application instantanée de 7KC et 24S-OHC n'a pas modulée le courant Kv3.1. Cependant, une incubation de 24 h des ovocytes en présence de 7KC et 24S-OHC, réduit respectivement le courant Kv3.1 de 28% et de 37%. Ceci suggère que le 7KC et le 24S-OHC n'agissent pas comme des bloqueurs du Kv3.1 par interaction avec le récepteurs. L'inhibition du courant Kv3.1 pourrait être la conséquence de l'induction de mécanismes intervenant dans le control de l'activation du canal Kv3.1 tels que : état de phosphorylation ou de carbonylation de Kv3.1 ; changement de localisation de Kv3.1 dans la membrane plasmique. Ces résultats montrent qu'en présence de 7KC et 24S-OHC les cellules 158N surexpriment Kv3.1b ; ceci pourrait correspondre à une réponse adaptative pour remédier à l'accumulation intracellulaire de K^+ . Comme K^+ reste élevé, l'hypothèse d'une surexpression de Kv3.1b non fonctionnelle (pouvant être la conséquence du stress oxydant) est plausible.

Etude clinique: Etude des relations entre homéostasie du potassium plasmatique et le métabolisme lipidique peroxysomale

D'importantes modifications du profil d'AG chez les patients atteints de maladies neurodégénératives ont été décrites tant au niveau central que périphérique (plasmatique et érythrocytaire). Des changements des taux de C22:0, C24:0 et C26:0 ont été observées ainsi qu'une diminution de DHA (C22:6 n-3) dans le contexte de la MA (**Kou et al., 2011 ; Lizard et al., 2012 ; Zarrouk et al., 2015**). Ainsi, en plus des biomarqueurs conventionnels de la maladie (protéine A β , rapport A β 1-40/ A β 1-42, tau phosphorylé), la très forte augmentation de C26:0 tant au niveau plasmatique qu'érythrocytaire a conduit à proposer cet AG comme biomarqueur de la MA (**Zarrouk et al., 2015**). Comme les AGTLC et la DHA sont substrat de la β -oxydation peroxysomale, leurs taux anormaux ont été expliqués par un dysfonctionnement du métabolisme peroxysomal (**Titorenko et al., 2011; Giordano et al., 2012; Lizard et al., 2012**). Par ailleurs, des changements quantitatifs de l'homéostasie potassique ont été également récemment décrits par des études *post mortem* chez les MA pendant les stades précoces de la maladie (**Mellon et al., 2009; Vitvitsky et al., 2012; Graham et al., 2015**). Pour déterminer le lien qui pourrait exister entre l'altération de l'homéostasie potassique et le dysfonctionnement du métabolisme lipidique peroxysomal, nous avons évalué la corrélation entre le taux de K^+ plasmatique et le taux des lipides associés au métabolisme peroxysomal (C22:0, C24:0, C26:0, acide pentacosanoïque (C25:0), DHA

(C22:6 n-3), EPA (C20:5 n-3), acide arachidonique (C20:4 n-6)) mesurés sur une cohorte de malades Alzheimer Tunisiens (**Zarrouk et al., 2015**). Parmi les différents paramètres analysés, seule une corrélation négative entre le taux de DHA plasmatique et la concentration plasmatique de K^+ a été révélée chez les MA. Cette corrélation négative mériterait d'être plus exploitée en fonction du stade de développement de la MA et dans d'autres maladies neurodégénératives. Nos données fournissent des preuves en faveur d'une baisse de la synthèse du DHA associée à une augmentation des taux plasmatiques de K^+ chez les MA.

Bien qu'une réduction du niveau de la transcription des gènes impliqués dans le transport du K^+ ait été identifiés, il est pas encore établi si la modulation de l'homéostasie potassique est une cause ou une conséquence de la MA (**Miller et al., 2013**). Les changements des taux de K^+ chez les MA ont été peu ou pas étudiés (**Vitvitsky et al., 2012; Graham et al., 2015**). A notre connaissance, c'est la première évaluation du taux plasmatique de K^+ chez les MA montrant un déséquilibre du niveau de K^+ plasmatique associé à des concentrations généralement diminuées de DHA. L'évaluation de l'homéostasie potassique au niveau cérébral chez les MA par **Vitvitsky et al., (2012)** montre une surcharge en K^+ au niveau du cervelet laissant supposer que ces altérations sont locales du fait qu'aucun changement de K^+ n'a été mis en évidence au niveau du LCR (**Vitvitsky et al., 2012**). La variation de la concentration plasmatique de K^+ pourrait être à l'origine de l'augmentation de la teneur cérébrale en K^+ du fait que le changement de concentration et / ou de distribution en K^+ provoquent des fluctuations plus marquées de la concentration en K^+ extracellulaire plutôt qu'intracellulaire (**Zacchia et al., 2016**).

Nos résultats peuvent également être expliqués par la diminution de l'influx ou de l'efflux de K^+ à cause de la rupture de la barrière hémato-encéphalique et / ou de la baisse du métabolisme énergétique cérébrale chez les MA. Par ailleurs, l'augmentation de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique est caractéristique du vieillissement et de la MA (**Marques et al., 2013**). En outre, une étude récente utilisant des modèles animaux de MA (souris PS2-APP ; souris transgéniques exprimant la protéine tau humaine ; souris knock-out APOE et APOE4) n'a pas montré d'augmentation de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (**Bien-Ly et al., 2015**). Ces arguments suggèrent que le changement de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique ne serait pas à l'origine des variations de l'homéostasie potassique au niveau central et périphérique.

La baisse des taux de DHA cérébraux et périphériques a été décrite en cas de troubles tels que la schizophrénie, l'hyperactivité ou la dépression, ainsi que dans le développement et la

progression de différentes maladies neurodégénératives comme la MA et la maladie de Parkinson (Gordon *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2012; Yassine *et al.*, 2017). De nouvelles approches thérapeutiques supposent qu'une supplémentation journalière en DHA pourrait prévenir le déclin cognitif et atténuer les troubles physiologiques du cerveau qui sont associés au vieillissement ou aux troubles neurologiques (Bazinnet *et al.*, 2014; Belkouch *et al.*, 2016). Une étude récente montre une corrélation négative entre le taux plasmatique de DHA et les taux de dérivés issus de la peroxydation lipidique mesurés chez des MA ayant bénéficié d'une supplémentation en DHA (Shichiri *et al.*, 2014). Ces différentes observations supposent qu'une augmentation de la concentration plasmatique de K^+ est associée à une baisse de la synthèse du DHA (réduction de la β -oxydation peroxysomale) et à la peroxydation lipidique qui pourrait entre autre altérer la fonctionnalité des canaux potassiques. Ainsi, l'étude de ces corrélations chez les patients Alzheimer pourrait aboutir à identifier des biomarqueurs de MA. Ces résultats constituent un argument supplémentaire en faveur des effets bénéfiques de la supplémentation en DHA qui pourrait réprimer l'augmentation de K^+ ; inversement, favoriser la diminution de K^+ pourrait contribuer à améliorer la synthèse de DHA et à réduire la peroxydation lipidique.

Etude sur souris transgéniques J20 de 9 mois : quantification et topographie de Kv3.1b et d'Abcd3 au niveau cérébral

Les voies de signalisation et les mécanismes, responsables de la toxicité des oligomères $A\beta$, sont encore très partiellement connus et pourraient constituer autant de cibles thérapeutiques potentielles. Ces voies de toxicité peuvent mettre en jeu divers médiateurs agissant comme des messagers intracellulaires et / ou synaptiques. Parmi ceux-ci, le canal Kv3.1b et les marqueurs de dysfonctionnement peroxysomaux apparaissent comme des candidats de choix, en se référant à notre étude menée sur les cellules 158N et BV-2. Ainsi, pour préciser si l'amyloïdogenèse est accompagnée par des changements de la distribution et /ou du niveau d'expression du canal Kv3.1b et/ou de l'expression d'Abcd3 (protéine majeure de la membrane peroxysomale) reflétant la quantité de peroxysomes, nous avons initié une étude *in vivo* sur des coupes sagittales de cerveaux de souris sauvages et transgéniques J20 femelles âgées de 9 mois. L'expression du canal Kv3.1b et du marqueur de masse du peroxysomal Abcd3 ont été recherchés en association avec des marqueurs de la MA (dépôts amyloïdes). Les dépôts amyloïdes ont été visualisés par coloration à la thioflavine T et au Rouge Congo. Nous avons choisi de travailler

sur des souris J20 femelles de 9 mois pour être dans des conditions d'amyloïdogénèse chez toutes les souris.

Les souris transgéniques J20 expriment un transgène de la protéine APP humaine, porteur de la mutation Swedish (K670N / M671L) et de la mutation Indiana (V717F) (deux mutations en-dehors de la séquence A β), responsables de formes familiales de MA (**Sturchler-Pierrat et al., 1997**). La présence des deux mutations a été vérifiée chez toutes les souris ayant été utilisées pour les expériences par un génotypage d'intérêt réalisé par l'équipe du Dr Catherine DESRUMAUX (Inserm, Montpellier, France). En raison de cette double mutation, ces animaux produisent de grandes quantités de peptide A β (et notamment de peptide A β ₁₋₄₂) au niveau de l'hippocampe et du néocortex, avec des dépôts diffus de peptide A β dans le gyrus denté et le néocortex vers 5–7 mois et des plaques vers 8–10 mois (**Sturchler-Pierrat et al., 1997**). Conformément à ces résultats, nous avons évalué le profil de distribution des plaques amyloïdes au cours du vieillissement (3, 6 et 9 mois) afin de sélectionner l'âge adapté à l'étude. A l'âge de 9 mois, nous avons révélé chez toutes les souris J20 des dépôts amyloïdes à par coloration à la thioflavine T et au Rouge Congo et cela a été confirmé en immunohistochimie avec l'anticorps anti-A β ₁₇₋₂₄. Ces structures sont absentes chez les souris sauvages de même sexe et du même âge.

Nous avons choisi d'utiliser des souris femelles, car les données épidémiologiques et histopathologiques indiquent aussi bien chez l'Homme que chez la souris que ce sont les femelles les plus susceptibles et les plus affecté par la MA (**Hirata-Fukae et al., 2008; Craig et al., 2010**).

Les souris J20 utilisées présentent aussi des déficits dans les fonctions d'apprentissage et de mémoire. Lors de cette étude, les souris ont présenté des déficits cognitifs et de mémoire à court terme dès l'âge de 3 mois évalués par le test de Labyrinthe en Y. A l'âge 6 mois, les capacités locomotrices, sensorielles, motivationnelles et exploratoires ont été significativement affectées chez les souris J20. L'apparition des troubles de mémoire de travail évalués par le labyrinthe T / Y ou le labyrinthe radial apparaissent donc avant la formation de dépôts amyloïdes ; ceci a également été montré chez des souris Tg2576 (**King et al., 1999; Arendash et al., 2004; Ohno et al., 2004**) ainsi que sur des travaux antérieurs sur souris J20 (**Lustbader et al., 2004**). Ces troubles peuvent être expliqués au moins en partie par diverses altérations du métabolisme des lipides (**Sanchez-Mejia et al., 2008**). Des niveaux accrus d'acide arachidonique (C20:4 n-6) et de ses métabolites, en particulier les prostaglandines, ont été mis en évidence dans le cerveau de souris J20 par activation de la

cPLA2 (**Fiala et al., 2002; Sanchez-Mejia et al., 2008**). Par ailleurs, une augmentation de l'activation de la cPLA2 a été mise en évidence dans l'hippocampe de ces souris transgéniques J20. Un lien entre l'activation de cette enzyme et les effets délétères sur les performances comportementales de ces animaux a été suspecté. Cette suspicion a été confirmée lorsque des souris J20 ont été croisées avec des souris cPLA2 $-/-$, l'inactivation constitutive du gène de la cPLA2 protégeant totalement les animaux hybrides contre les déficits mnésiques et d'apprentissage observés chez les animaux dont les gènes cPLA2 étaient fonctionnels (**Sanchez-Mejia et al., 2008**). Les auteurs ont également décrit une phosphorylation accrue de la cPLA2 au niveau de l'hippocampe de ces souris, ce qui témoigne d'une activation de cette enzyme. De plus, une augmentation de la phosphorylation de la cPLA2 a également été observée dans des échantillons issus de cerveaux de patients atteints de la MA (**Sanchez-Mejia et al., 2008**).

Une dysrégulation de Kv3.1 a été suggérée pour contribuer aux altérations neuronales et gliales de la MA (**Franciosi et al., 2006**). Récemment, il a été montré que l'ataxie épino-cérébelleuse humaine SCA13 est due aux mutations du gène KCNC3 codant pour Kv3.3 (**Waters et al., 2006; Figueroa et al., 2011**). Ces mutations réduisent l'activité de ce canal et auraient des effets marqués dans les zones de colocalisation de Kv3.3 et Kv3.1 (**Figueroa et al., 2011**).

Lors de notre étude, l'évaluation quantitative de l'immunomarquage de Kv3.1b dans le groupe de souris transgéniques J20, en comparaison avec les souris contrôles, au niveau des différentes structures cérébrales (hippocampe : cellules pyramidales de la corne d'Ammon (CA1, CA2 et CA3) ; couche polymorphe et couche granuleuse du gyrus denté (GD); subiculum et cortex cérébraux), nous a permis de révéler une baisse de l'expression de Kv3.1b au niveau du gyrus denté et du cortex occipital chez les souris J20. A l'exception de l'étude de **Boda et al., (2011)**, l'évaluation quantitative du niveau d'expression de Kv3.1 ou de sa modulation est encore manquante. En se référant à cette étude, l'analyse du profil d'expression des quatre sous-unités de Kv3 (Kv3.1, Kv3.2, Kv3.3, Kv3.4) dans les régions de cerveau de la souris APPPS1 disséquées (bulbe olfactif, septum, néocortex, hippocampe, tronc cérébral et cervelet) a montré qu'à l'exception de Kv3.3 non exprimé après la naissance, l'expression de Kv3.1, Kv3.2, Kv3.4 est stable pendant le vieillissement. En revanche, une baisse du niveau d'expression de Kv3.1 a été détectée dans le néocortex de souris APPPS1 par rapport au souris sauvages (**Boda et al., 2011**). Ceci suggère qu'une diminution des courants Kv3.1 pourrait jouer un rôle dans la progression de la MA.

Différentes approches expérimentales sont en faveur d'une implication du métabolisme peroxysomal dans la physiopathologie de la MA. Actuellement, il est bien établi que l'activité peroxysomale diminue avec l'âge (**Titorenko et al., 2011**). Le dysfonctionnement du peroxysome a été associé avec le vieillissement et l'apparition des démences chez l'homme. En effet, une diminution de l'activité catalase, une faible synthèse des plasmalogènes et une sensibilité plus importante à la mort cellulaire notamment par nécrose (**Marcus et al., 1998, Goodenowe et al., 2007; Manivannan et al., 2012; López-Erauskin et al., 2013**) pourrait favoriser l'apparition de maladies neurodégénératives comme la MA (**Terlecky et al., 2006; Lizard et al., 2012**). De même, une réduction des niveaux de l'éthanolamine plasmalogène et de la choline plasmalogène dans les régions cérébrales et dans les érythrocytes de patients MA a été décrite; cette réduction était positivement corrélée avec la sévérité de la maladie (**Igarashi et al., 2011; Wood, 2010**). L'accumulation de C22:0 et des AGTLCs (C24:0, C26:0) a été expliqué par une diminution de la β -oxydation peroxysomale et / ou une diminution du nombre des peroxysomes (**Kou et al., 2011**).

L'atteinte peroxysomale lors de processus d'initiation de la MA a été révélée par l'apparition d'altérations peroxysomales observées chez des souris transgénique modèle de la MA (Tg2576) en l'absence de lésions anatomiques caractéristiques de la maladie (**Cimini et al., 2009**). De plus, l'inhibition de la β -oxydation peroxysomale par la thioridazine chez le rat induit une accumulation d'AGTLC qui stimule la génération d'A β par induction de l'expression d'APP et de β -sécrétase (**Shi et al., 2012**).

L'observation d'Abcd3 par microscopie montre un marquage général de la représentation sagittale des tissus cérébraux des deux groupes de souris épargnant principalement l'hippocampe, l'ensemble des cortex et le cervelet. La quantification de l'intensité du marquage d'Abcd3 a révélé une baisse du niveau d'expression de ce marqueur peroxysomal chez les souris J20 comparativement au contrôle au niveau de l'hippocampe, dans les cellules pyramidales de la corne d'Ammon (CA1, CA2 et CA3), dans la couche polymorphe et la couche granuleuse du GD mais pas dans le subiculum et au niveau de l'ensemble des cortex cérébraux sauf dans le cortex occipital. Comme Abcd3 est considéré comme un marqueur de masse peroxysomale (**Santos et al., 1994**), ces résultats confirment une diminution du nombre des peroxysomes au niveau de ces régions (hippocampiques ou corticales) chez les souris J20. Par ailleurs, le marqueur de biogenèse Pex14 est également utilisé pour évaluer le nombre de peroxysomes (**Ahlemeyer et al., 2007**). Comparativement à nos résultats, **Fanelli et al.,**

(2013) ont montré une induction de l'expression du transporteur membranaire peroxysomal Abcd3 et de la première enzyme de β -oxydation peroxysomale (Acox-1) chez des souris transgéniques portant la mutation Suédoise de l'APP humaine dès l'âge de 3 mois reflétant la nécessité d'une β -oxydation efficace comme réponse compensatrice au dysfonctionnement des mitochondries (Fanelli *et al.*, 2013). Ces changements précoces sont en accord avec les modifications comportementales, électrophysiologiques, ultrastructurales et moléculaires rapportées dans ce modèle au même âge (D'Amelio *et al.*, 2011). L'induction de l'expression d'Abcd3 pendant les premiers stade de la MA reflète un effet compensateur pour assurer une β -oxydation peroxysomale efficace (Morita *et al.*, 2012). La baisse du niveau d'Abcd3 pourrait être à l'origine de l'accumulation des AGTLC et en faveur de la diminution de la biosynthèse de DHA. En accord avec notre étude, les souris transgéniques portant la mutation Suédoise de l'APP humaine ont présenté une baisse d'Abcd3 entre 3 et 6 mois (âge d'apparition des caractéristiques pathologiques de la MA). La réduction du niveau d'expression d'ABCD3 a également été observée chez les patients Alzheimer (Kou *et al.*, 2011). La baisse du niveau d'expression d'ABCD3 pourrait être expliqué par la mise en place de processus oxydatifs en présence des plaques amyloïdes. En effet, le peroxysome est la cible des ROS, son activité et sa biogenèse sont considérablement réduits de manière irréversible avec l'âge en conditions de stress oxydatif (Titorenko *et al.*, 2011; Lismont *et al.*, 2015; Farr *et al.*, 2016); les dysfonctions peroxisomales peuvent par ailleurs impacter l'activité mitochondriale dont les altérations sont bien établies au cours de la MA (Fransen *et al.*, 2016). Il est intéressant de noter une importante qu'Abcd3 est fortement exprimé au niveau des cellules de Purkinje du cervelet qui n'expriment pas ou très faiblement Kv3.1b que ce soit dans le groupe de souris normale et dans le groupe de souris Alzheimer.

Sur souris J20, nos résultats soulignent des altérations peroxysomales et indiquent des modifications de l'expression de Kv3.1 au niveau de différentes zones cérébrales. Ceci suggère un lien entre activité peroxysomale et activité neuronale : des dysfonctions peroxysomales par le biais de modification de l'activités de canaux ioniques (canaux K^+ entre autre) pourraient perturber à termes la qualité de l'influx nerveux. Il serait intéressant de préciser comment l'homéostasie du potassium peut influencer l'activité peroxysomale et réciproquement comment l'activité peroxysomale est à même d'influencer les taux de K^+ . Ceci est envisageable à l'aide d'outils pharmacologiques et de modèles cellulaires déficients en peroxysomes ou en certains de ses constituants.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les oxystérols et les AGTLC ont été associés à plusieurs maladies dégénératives, mais peu d'informations sont disponibles sur les mécanismes cellulaires impliqués dans leur cytotoxicité. Le déclenchement de ces processus dégénératifs implique, au niveau cellulaire, un stress oxydatif et des réactions inflammatoires induisant à plus ou moins long termes l'altération des organites cellulaires (mitochondrie, lysosome, peroxysme) (**Trompier *et al.*, 2014**). Le stress oxydant et l'inflammation ont souvent été associés à des ruptures de l'homéostasie potassique (**Cotella *et al.*, 2012**; **Schmid-Burgk *et al.*, 2016**).

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés aux altérations de l'environnement lipidique impliquées dans la neurodégénérescence en prenant plus particulièrement en compte l'impact de certains lipides bioactifs (oxystérols, AGTLC) sur l'homéostasie potassique dans des oligodendrocytes et des cellules microgliales. Nous avons essentiellement centré notre étude sur la pathophysiologie de la MA où des augmentations des taux d'oxystérols et d'AGTLC sont observés tant au niveau central que périphérique.

L'originalité de notre travail repose sur le fait qu'une régulation de la $[K^+]_i$ semble être une nouvelle approche pour réduire la cytotoxicité des oxystérols et des AGTLC. La modulation de Kv3.1b pourrait être une cible thérapeutique. L'étude de l'éventuelle contribution de l'homéostasie potassique à la lipotoxicité des oxystérols et des AGTLC associés à la progression de la MA apparaît essentielle. Comme il a été décrit que le canal Kv3.1 a un rôle prépondérant dans la régulation de fonctions mnésiques altérées chez les MA nous avons focalisé notre étude sur ce canal potassique.

Nous avons privilégié de réaliser nos approches expérimentales sur des cellules gliales, (oligodendrocytes) et microgliales du fait qu'elles assurent un soutien structural et métabolique aux neurones et interviennent dans l'émission et la conduction des signaux nerveux. Lors du processus pathologique ces cellules contribuent à une phase cellulaire complexe. Nous avons sélectionné les deux oxystérols les plus associés aux pathologies dégénératives, le 7-KC et le 24S-OHC et parmi les AGTLC, le C24:0.

Ainsi, en utilisant les lignées cellulaires d'oligodendrocytes murins 158N et microgliale BV-2, le travail de Thèse nous a permis de :

- Comparer les effets cytotoxiques (croissance cellulaire, perte d'adhésion, chute du potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi_m$), surproduction d'espèces radicalaires de l'oxygène) sous l'effet du 7KC, 24S-OHC et C24:0. Nous avons observé que ces lipides induisaient des réponses différentes sur les deux lignées cellulaires. Nous pouvons conclure que les cellules ne répondent pas aux oxystérols et aux AGTLC de la même façon.
 - Comme les cellules les plus sensibles sont les oligodendrocytes 158N, ceci suggère que ces derniers constituent des cibles pharmacologiques préférentielles et qu'il est important d'identifier des molécules capables de s'opposer à la cytotoxicité induites par le 7KC, 24S-OHC et C24:0.
- Mettre en évidence, une augmentation du taux intracellulaire de K^+ . L'accumulation intracellulaire de K^+ est plus marquée en présence des oxystérols que de C24:0. Par ailleurs, cette augmentation est plus marquée dans les oligodendrocytes que dans les cellules microgliales. Sur la base de corrélations, il semble que l'augmentation de $[K^+]_i$ fait partie du processus de lipotoxicité. Toutefois, Ces corrélations soulignent des liens entre l'homéostasie potassique et les paramètres associés à la mort cellulaire (dépolérisation des mitochondries, génération de ROS et augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique à l'IP).
 - Ces corrélations permettent d'envisager de nouvelles cibles pharmacologiques en relation avec la $[K^+]_i$ pour développer des traitements spécifiques et efficaces de la MA. Il faudrait identifier des activateurs des canaux potassium permettant d'évacuer le K^+ intracellulaire.
- Montrer que la lipotoxicité de 7KC, 24S-OHC et C24:0 implique les Kv. Toutefois, la lipotoxicité du C24:0 module moins les Kv que les oxystérols (7KC ; 24S-OHC). Avec C24:0, aucune modulation de l'expression de Kv3.1b n'a été observée et l'impact est faible sur l'accumulation de K^+ intracellulaire. Comme, la 4-AP augmente peu la mort cellulaire en présence de 7KC et de 24S-OHC, mais augmente fortement la mort cellulaire en présence de C24:0, ceci suggère que le recrutement des Kv dans la lipotoxicité induite par le C24:0 est négligeable. Pour mieux appréhender le rôle de la

[K⁺]_i dans la lipotoxicité de ces composés, on suppose que la forte rétention de K⁺ est probablement initiée par l'incorporation de 7KC et 24S-OHC dans les microdomaines lipidiques de la membrane plasmique, appelés radeaux lipidiques. Cette incorporation de 7KC et 24S-OHC dans les radeaux pourrait induire une délocation des Kv avec pour conséquence une réduction de leurs activités conduisant à une accumulation de K⁺. Nous devons également prendre en compte l'impact du 7KC, 24S-OHC et C24:0 sur la structure des Kv. Les oxystérols en s'intégrant dans la membrane pourraient modifier les propriétés physicochimiques de la membrane. Les ROS générés par 7KC, 24S-OHC et C24:0 pourraient aussi induire une carbonilation des Kv affectant ainsi la conductibilité des canaux et par conséquent l'efflux de K⁺. Il n'est pas à exclure qu'en plus des Kv, la rétention du K⁺ induite sous l'action du 7KC, 24S-OHC et C24:0 pourrait impliquer divers familles de canaux potassiques. Nos études en cours ont montré une activation de P2X7 en présence de 7KC et 24S-OHC. Cette activation de P2X7 semble tardive et n'est observée qu'à forte concentration (à partir de 25 µM) alors que l'accumulation de potassium attribuée à une inactivation de Kv survient dès 2,5 µM.

- Les études *in vitro* devront donc cibler d'autres canaux, plus particulièrement, le canal K-ATP et les canaux potassiques calcium dépendants (BK et SK) ou d'autres récepteurs comme les purinorécepteurs P2X7 ou le récepteur NMDA.
- Il serait intéressant d'inactiver le canal Kv3.1 par des des miRNAs chez la souris J20, utilisée comme modèle d'Alzheimer, et de voir dans quelle mesure cela affecte la survenue de l'amyloïdogenèse et l'apparition des troubles comportementaux.
- Il serait informatif de voir comment l'injection intracérébrale de 7KC, 24S-OHC et C24:0 par stéréotaxie induit sur les cellules nerveuses au niveau des zones hippocampiques et corticales des lésions affectant l'homéostasie du potassium, le stress oxydant et la mort cellulaire.
- Décrire l'expression de Kv3.1, par différentes techniques, dans les 158N et les BV-2. Ces deux lignées serviront de modèle d'étude de l'expression et de l'activité de ce canal. L'analyse de l'expression de Kv3.1b par les cellules 158N montre que le 7KC et le 24S-OHC induisent l'expression de Kv3.1b. Par ailleurs, aucune modulation de l'expression de Kv3.1b n'a été observée en présence de C24:0. Sur les BV-2 (moins sensibles au 7KC, 24S-OHC et C24:0), des périodes d'incubation plus longues ont été

nécessaires pour induire l'expression de Kv3.1b. Ceci suggère que la modulation de l'expression de Kv3.1b pourrait dépendre du niveau de cytotoxicité et conforte l'hypothèse d'une implication de Kv3.1b dans la lipotoxicité. Dans ce sens, une corrélation positive a été révélée entre l'expression de Kv3.1b et l'induction de la mort cellulaire.

- En fonction de ces résultats, il convient de rechercher à quel niveau cellulaire est exprimé Kv3.1b. Comme Kv3.1b pourrait être présent au niveau mitochondriale (fractionnement subcellulaire en cours pour évaluer cette hypothèse), ce dernier pourrait contribuer aux dysfonctions mitochondriales induites en particulier par le 7KC et le 24S-OHC.

La **Figure 79** résume les effets des différents lipides testés sur la concentration intracellulaire de K^+ et sur l'expression de Kv3.1b au niveau oligodendrocytaire ainsi que sur la désorganisation de la membrane plasmique, la chute du potentiel transmembranaire mitochondriale et la surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

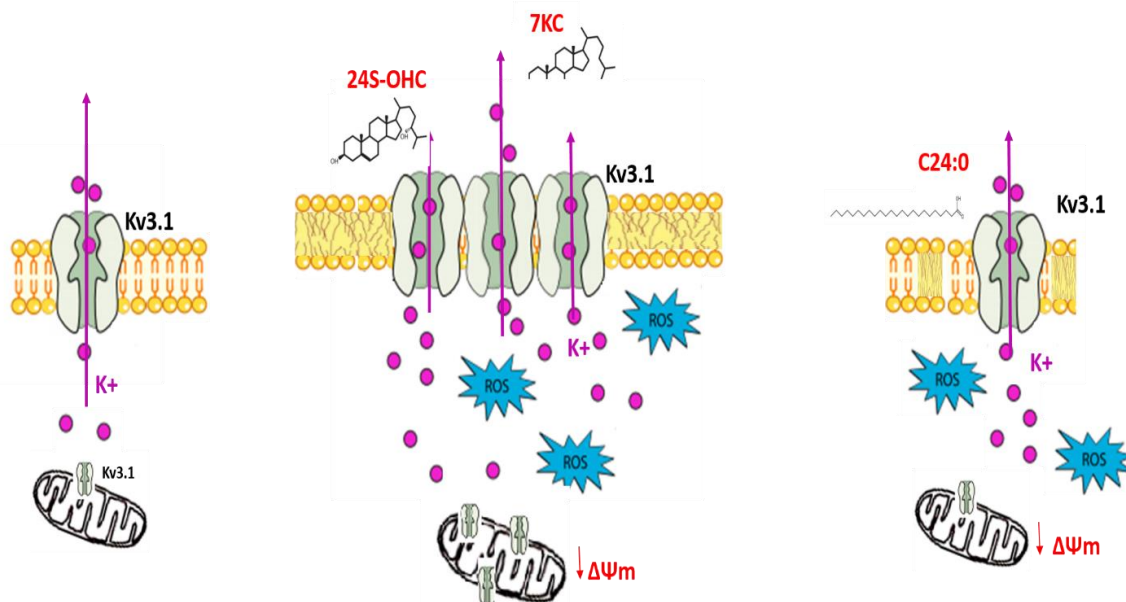


Figure 79: Modulation de l'expression de Kv3.1b et de $[K^+]_i$ au cours de la mort cellulaire induite par le 7KC, le 24S-OHC et le C24:0 sur des oligodendrocytes murins 158N (localisation hypothétique de Kv3.1b au niveau de la mitochondrie, fractionnement subcellulaire en cours pour évaluer l'hypothèse).

De plus, l'impact de 7KC et 24S-OHC sur l'activité du canal Kv3.1 a aussi été étudié sur le modèle d'ovocyte de xénope par la technique de voltage clamp. Les résultats préliminaires obtenus montre que:

- 7KC et 24S-OHC réduisent le potentiel du canal courant Kv3.1 avec un changement des cinétiques d'activation ce qui pourrait expliquer, en partie, la rétention intracellulaire du K^+ dans le milieu intracellulaire.
 - Il serait intéressant de déterminer si les différentes molécules décrites capables de s'opposer aux activités cytotoxiques (oxydation, inflammation, mort cellulaire) des oxystérols (Vit E (alpha- et gamma-tocophérols), DHA, diméthyl fumarate, monométhyl fumarate, acide oléique ...) abaissent la $[K^+]_i$. Ceci permettrait de démontrer la part prise par le K^+ dans la lipotoxicité.
 - Par ailleurs, des molécules capables d'activer Kv3.1 pourraient aussi avoir un intérêt pharmacologique. Dans ce contexte, et avec notre modèle d'oligodendrocytes 158N, il serait intéressant d'évaluer l'effet d'activateurs spécifiques à Kv3.1 issus de la purification de venin de scorpion *Androctonus australis hector* en prenant en compte leur impact sur la $[K^+]_i$, sur les organites (mitochondrie, peroxysome, lysosome) et sur la viabilité. Leurs effets sur la qualité de la myéline peuvent être envisagés. De même, des extraits de venin d'abeilles pourraient être étudiés.

Pour déterminer d'éventuelles associations entre le taux de potassium plasmatique et le métabolisme lipidique peroxysomal, des analyses ont été réalisées sur des plasmas de MA tunisiens. Ceci a permis d'observer une corrélation négative entre le taux de DHA plasmatique et la concentration de K^+ . Ainsi, l'homéostasie potassique pourrait influencer la biogénèse et la fonction peroxysomale.

- On peut se demander si chez des patients Alzheimer recevant une supplémentation en acides gras omega 3 et 9 (EPA, DHA, oléate), cytoprotecteurs vis-à-vis du 7KC et de 24S-OHC, si l'homéostasie du potassium peut être rétablie et si cela contribue directement ou indirectement à améliorer le statut clinique du patient.

L'étude sur le modèle de souris transgéniques J20 a révélé une diminution de la masse peroxysomale au niveau des zones hippocampiques et cortivcales ainsi qu'une diminution de l'expression de Kv3.1 au niveau du gyrus denté et du cortex occipital.

Ces observations renforcent l'intérêt porté à ces deux marqueurs (Kv3.1 et Abcd3) afin de préciser les éventuelles relations entre la $[K^+]_i$ et la biogenèse peroxysomale dans le contexte de la MA. Dans ce contexte, nous envisageons d'étudier l'expression et l'activité de la catalase, enzyme spécifique du peroxysome.

- Des microdissections suivies de RT-qPCR sont aussi planifiées pour déterminer le niveau d'expression de Kv3.1 et des enzymes responsables de l'oxydation enzymatique du cholestérol (CYP46A1, CYP27A1) et des enzymes impliquées dans la β -oxydation peroxysomale contribuant à la dégradation des AGTLC et à la biosynthèse de DHA.

Dans des perspectives thérapeutiques, ce travail de Thèse peut donner lieu à plusieurs valorisations industrielles :

- ✓ Etude des interactions potentielles de 7KC, 24S-OHC et C24:0, avec Kv3.1 et P2X7 (docking),
- ✓ Criblage de modulateurs de Kv3.1 (biobanque de toxines) sur le modèle cellulaire 158N qui exprime fortement Kv3.1b pour atténuer la lipotoxicité,
- ✓ Dans un contexte de valorisation, en raison de l'expertise de l'IPT sur les nano-anticorps, il pourrait être intéressant de produire des nano-anticorps contre le 7KC qui n'est pas métabolisé chez l'homme. Ceci pourrait être un moyen d'éliminer ce composé impliqué dans de nombreuses maladies liées à l'âge incluant des neurodégénérescences ce qui représente une nouvelle approche thérapeutique propre à un développement industriel.

Ce travail de Thèse révèle pour la première fois qu'une rupture de l'homéostasie potassique intracellulaire est associée aux propriétés cytotoxiques du 7KC, 24S-OHC et C24:0. Ces résultats suggèrent que l'altération du métabolisme lipidique pourrait influencer l'activité des canaux potassiques qui semblent impliquer dans la lipotoxicité. Ainsi, réduire la $[K^+]_i$ ou moduler l'activité de Kv3.1 pourrait constituer de nouvelles cibles pharmacologiques pour prévenir la neurodégénérescence.

Résumé :

Le potassium (K^+) est impliqué dans la régulation de l'excitabilité cellulaire, la régulation du cycle cellulaire, la viabilité cellulaire, la neuroprotection et le maintien des fonctions microgliales et oligodendrocytaires. Le dysfonctionnement des canaux potassiques, décrit dans plusieurs maladies neurodégénératives comme la Maladie d'Alzheimer (MA), la sclérose en plaques (SEP), la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington, pourrait être une potentiel cible thérapeutique. Les mécanismes toxiques sous-jacents de ces pathologies neurodégénératives impliquent des oxystérols, dérivés oxydés du cholestérol, et des acides gras en relation avec le métabolisme peroxysomal. Le 7-cétocholestérol (7KC), le 24S-hydroxycholestérol (24S-OHC) et l'acide tétracosanoïque (C24:0), souvent trouvés à des taux élevés au niveau du cerveau et dans le plasma de patients atteints de maladies neurodégénératives (MA, maladie de Nieman-Pick, SEP, maladie de Parkinson, maladie de Huntington et X-ALD) conduisent une rupture de l'équilibre Redox qui aboutirait à la neurodégénérescence. Dans ce contexte, il est intéressant de déterminer l'éventuelle connexion entre environnement lipidique et homéostasie potassique. L'étude *in vitro* a été réalisée sur des oligodendrocytes murins 158N et les cellules microgliale BV-2. Nous avons montré que la lipotoxicité du 7KC, 24S-OHC et C24:0 implique une rétention du K^+ faisant intervenir les canaux potassium voltage dépendant (Kv). Ces résultats ont montré que l'inhibition des canaux Kv conduisant à une augmentation la $[K^+]_i$ contribue à la cytotoxicité du 7KC, 24S-OHC et C24:0. Nous nous sommes focalisés sur le canal Kv3.1b. La rétention du K^+ induite par les oxystérols (7KC et 24S-OHC) serait sous le contrôle de Kv3.1b. L'étude clinique réalisée sur du plasma de MA a révélé une corrélation négative entre le taux d'acide docosahexaénoïque (DHA) et la concentration de K^+ . Chez les souris transgéniques J20, modèle de la MA, l'étude de la topographie d'expression de Kv3.1b et d'Abcd3, au niveau de l'hippocampe et du cortex, a montré une baisse de l'expression de ces deux marqueurs. Dans leur ensemble, les résultats obtenus ont établi des relations entre lipotoxicité, métabolisme peroxysomal et altération de l'homéostasie potassique dans la neurodégénérescence et suggèrent une possible modulation de l'expression et de l'activité de kv3.1b dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives.

Mots-clés : 7-cétocholestérol, 24S-hydroxycholestérol, acide tétracosanoïque (C24:0), potassium, canaux Kv, Kv3.1b, neurodégénérescence, maladie d'Alzheimer, oligodendrocytes murins 158N, cellules microgliales murines BV-2.

Abstract:

Potassium (K^+) is involved in the regulation of cellular excitability, cell cycle regulation, cell viability, neuroprotection and maintenance of microglial and oligodendrocytic functions. Potassium dysfunction, described in several neurodegenerative diseases such as Alzheimer's Disease (AD), multiple sclerosis (MS), Parkinson's disease and Huntington's disease, may be a potential therapeutic target. The underlying toxic mechanisms of these neurodegenerative pathologies involve oxysterols, which are oxidized cholesterol derivatives, and fatty acids including those associated with peroxisomal metabolism. 7-ketocholesterol (7KC), 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) and tetracosanoic acid (C24:0), often found at increased levels in the brain and plasma of patients with neurodegenerative diseases (Niemann-Pick disease, MS, Parkinson's disease, Huntington's disease and X-ALD) lead to a breakdown of the redox equilibrium leading to neurodegeneration. In this context, it is interesting to determine the possible connection between the lipid environment and potassium homeostasis. The *in vitro* study was carried out on 158N murine oligodendrocytes and microglial BV-2 cells. We have shown that the lipotoxicity of 7KC, 24S-OHC and C24:0 implies retention of K^+ involving the voltage dependent potassium channels (Kv). These results have shown that inhibition of Kv channels lead to an increase in $[K^+]$ contributing to the cytotoxicity of 7KC, 24S-OHC and C24:0. The retention of K^+ induced by oxysterols (7KC and 24S-OHC) would be under the control of Kv3.1b. A clinical study, on plasma of patients with Alzheimer's disease, revealed a negative correlation between docosahexaenoic acid (DHA) and K^+ concentration. In the J20 mice, a transgenic model of Alzheimer's disease, the expression of Kv3.1b and Abcd3 was decreased in the hippocampus and cortex. Overall, the results obtained established relationships between lipotoxicity, peroxisomal metabolism and potassium homeostasis in neurodegeneration and suggest a possible modulation of the expression and activity of kv3.1b in the pathophysiology of neurodegenerative diseases. So, modulation of Kv3.1 could constitute a new therapeutic approach against some neurodegenerative diseases.

Keywords: 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol, tetracosanoic acid (C24:0), potassium, Kv channels, Kv3.1b, neurodegeneration, Alzheimer's disease, 158N murine oligodendrocytes, murine microglial BV-2 cells

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abedin, L., Lien, E.L., Vingrys, A.J., and Sinclair, A.J. (1999). The effects of dietary alpha-linolenic acid compared with docosahexaenoic acid on brain, retina, liver, and heart in the guinea pig. *Lipids* 34, 475–482.
- Abildayeva, K., Jansen, P.J., Hirsch-Reinshagen, V., Bloks, V.W., Bakker, A.H.F., Ramaekers, F.C.S., de Vente, J., Groen, A.K., Wellington, C.L., Kuipers, F., et al. (2006). 24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 281, 12799–12808.
- Abraham, C.R. (2001). Reactive astrocytes and alpha1-antichymotrypsin in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 22, 931–936.
- Abramov, A.Y., Canevari, L., and Duchen, M.R. (2004). Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *J. Neurosci.* 24, 565–575.
- Addona, G.H., Sandermann, H., Kloczewiak, M.A., Husain, S.S., and Miller, K.W. (1998). Where does cholesterol act during activation of the nicotinic acetylcholine receptor? *Biochim. Biophys. Acta* 1370, 299–309.
- Akiyama, H., Arai, T., Kondo, H., Tanno, E., Haga, C., and Ikeda, K. (2000). Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 14 Suppl 1, S47-53.
- Akoh, C.C., and Chapkin, R.S. (1990). Composition of mouse peritoneal macrophage phospholipid molecular species. *Lipids* 25, 613–617.
- Albert, M.S. (2011). Changes in cognition. *Neurobiol. Aging* 32 Suppl 1, S58-63.
- Aliev, G., Obrenovich, M.E., Reddy, V.P., Shenk, J.C., Moreira, P.I., Nunomura, A., Zhu, X., Smith, M.A., and Perry, G. (2008). Antioxidant therapy in Alzheimer's disease: theory and practice. *Mini Rev Med Chem* 8, 1395–1406.
- Allaman, I., Gavillet, M., Bélanger, M., Laroche, T., Viertl, D., Lashuel, H.A., and Magistretti, P.J. (2010). Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability. *J. Neurosci.* 30, 3326–3338.
- Alonso, A.C., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1994). Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5562–5566.
- Alonso, A.D., Grundke-Iqbal, I., Barra, H.S., and Iqbal, K. (1997). Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 298–303.
- Alonso, M.A., and Millán, J. (2001). The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J. Cell. Sci.* 114, 3957–3965.
- Aluise, C.D., Robinson, R.A.S., Cai, J., Pierce, W.M., Markesbery, W.R., and Butterfield,

- D.A. (2011). Redox proteomics analysis of brains from subjects with amnesic mild cognitive impairment compared to brains from subjects with preclinical Alzheimer's disease: insights into memory loss in MCI. *J. Alzheimers Dis.* *23*, 257–269.
- Andreani, A., Leoni, A., Locatelli, A., Morigi, R., Rambaldi, M., Pietra, C., and Villetti, G. (2000). 4-Aminopyridine derivatives with anti-amnesic activity. *Eur J Med Chem* *35*, 77–82.
- Andrieu-Abadie, N., Gouazé, V., Salvayre, R., and Levade, T. (2001). Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* *31*, 717–728.
- Angulo, M.C., Le Meur, K., Kozlov, A.S., Charpak, S., and Audinat, E. (2008). GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog. Neurobiol.* *86*, 297–303.
- Astarita, G., Jung, K.-M., Berchtold, N.C., Nguyen, V.Q., Gillen, D.L., Head, E., Cotman, C.W., and Piomelli, D. (2010). Deficient liver biosynthesis of docosahexaenoic acid correlates with cognitive impairment in Alzheimer's disease. *PLoS ONE* *5*, e12538.
- Atwood, C.S., Moir, R.D., Huang, X., Scarpa, R.C., Bacarra, N.M., Romano, D.M., Hartshorn, M.A., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1998). Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J. Biol. Chem.* *273*, 12817–12826.
- Atwood, C.S., Moir, R.D., Huang, X., Scarpa, R.C., Bacarra, N.M., Romano, D.M., Hartshorn, M.A., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1998). Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J. Biol. Chem.* *273*, 12817–12826.
- Avshalumov, M.V., and Rice, M.E. (2003). Activation of ATP-sensitive K⁺ (K(ATP)) channels by H₂O₂ underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 11729–11734.
- Baarine, M., Andréoletti, P., Athias, A., Nury, T., Zarrouk, A., Ragot, K., Vejux, A., Riedinger, J.-M., Kattan, Z., Bessede, G., et al. (2012a). Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid--treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins. *Neuroscience* *213*, 1–18.
- Baarine, M., Ragot, K., Genin, E.C., El Hajj, H., Trompier, D., Andreoletti, P., Ghandour, M.S., Menetrier, F., Cherkaoui-Malki, M., Savary, S., et al. (2009). Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytic cell lines (158N, 158JP): potential models for the study of peroxisomal disorders associated with dysmyelination processes. *J. Neurochem.* *111*, 119–131.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* *120*, 483–495.
- Balasubramanian, N., Scott, D.W., Castle, J.D., Casanova, J.E., and Schwartz, M.A. (2007). Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1381–1391.
- Baloyannis, S.J. (2006). Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*

9, 119–126.

- Bankers-Fulbright, J.L., Kephart, G.M., Loegering, D.A., Bradford, A.L., Okada, S., Kita, H., and Gleich, G.J. (1998). Sulfonyleureas inhibit cytokine-induced eosinophil survival and activation. *J. Immunol.* *160*, 5546–5553.
- Barceló-Coblijn, G., Kitajka, K., Puskás, L.G., Hogyes, E., Zvara, A., Hackler, L., and Farkas, T. (2003). Gene expression and molecular composition of phospholipids in rat brain in relation to dietary n-6 to n-3 fatty acid ratio. *Biochim. Biophys. Acta* *1632*, 72–79.
- Barela, A.J., Waddy, S.P., Lickfett, J.G., Hunter, J., Anido, A., Helmers, S.L., Goldin, A.L., and Escayg, A. (2006a). An epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A that decreases channel excitability. *J. Neurosci.* *26*, 2714–2723.
- Barghorn, S., and Mandelkow, E. (2002). Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* *41*, 14885–14896.
- Barouki, R. (2006). [Ageing free radicals and cellular stress]. *Med Sci (Paris)* *22*, 266–272.
- Barres, B.A. (1991). Glial ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* *1*, 354–359.
- Barres, B.A., and Smith, S.J. (2001). Neurobiology. Cholesterol--making or breaking the synapse. *Science* *294*, 1296–1297.
- Barth, B.M., Gustafson, S.J., Hankins, J.L., Kaiser, J.M., Haakenson, J.K., Kester, M., and Kuhn, T.B. (2012). Ceramide kinase regulates TNF α -stimulated NADPH oxidase activity and eicosanoid biosynthesis in neuroblastoma cells. *Cell. Signal.* *24*, 1126–1133.
- Bartzokis, G. (2011). Alzheimer's disease as homeostatic responses to age-related myelin breakdown. *Neurobiol. Aging* *32*, 1341–1371.
- Bartzokis, G., Lu, P.H., Tingus, K., Mendez, M.F., Richard, A., Peters, D.G., Oluwadara, B., Barrall, K.A., Finn, J.P., Villablanca, P., et al. (2010). Lifespan trajectory of myelin integrity and maximum motor speed. *Neurobiol. Aging* *31*, 1554–1562.
- Basurto-Islas, G., Luna-Muñoz, J., Guillozet-Bongaarts, A.L., Binder, L.I., Mena, R., and García-Sierra, F. (2008). Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *67*, 470–483.
- Batchelor, P.E., Porritt, M.J., Martinello, P., Parish, C.L., Liberatore, G.T., Donnan, G.A., and Howells, D.W. (2002). Macrophages and Microglia Produce Local Trophic Gradients That Stimulate Axonal Sprouting Toward but Not beyond the Wound Edge. *Mol. Cell. Neurosci.* *21*, 436–453.
- Bauman, D.R., Bitmansour, A.D., McDonald, J.G., Thompson, B.M., Liang, G., and Russell, D.W. (2009). 25-Hydroxycholesterol secreted by macrophages in response to Toll-like receptor activation suppresses immunoglobulin A production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 16764–16769.
- Bazan, N.G. (2009). Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-

- derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81, 205–211.
- Beatty, W.W., Salmon, D.P., Butters, N., Heindel, W.C., and Granholm, E.L. (1988). Retrograde amnesia in patients with Alzheimer's disease or Huntington's disease. *Neurobiol. Aging* 9, 181–186.
- Béchade, C., Cantaut-Belarif, Y., and Bessis, A. (2013). Microglial control of neuronal activity. *Front Cell Neurosci* 7, 32.
- Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1998). Mitochondrial aging: open questions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 854, 118–127.
- Beeton, C., Barbaria, J., Giraud, P., Devaux, J., Benoliel, A.M., Gola, M., Sabatier, J.M., Bernard, D., Crest, M., and Béraud, E. (2001a). Selective blocking of voltage-gated K⁺ channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *J. Immunol.* 166, 936–944.
- Behrendt, G., Baer, K., Buffo, A., Curtis, M.A., Faull, R.L., Rees, M.I., Götz, M., and Dimou, L. (2013). Dynamic changes in myelin aberrations and oligodendrocyte generation in chronic amyloidosis in mice and men. *Glia* 61, 273–286.
- Benitez, B.A., Cruchaga, C., and United States–Spain Parkinson's Disease Research Group (2013). TREM2 and neurodegenerative disease. *N. Engl. J. Med.* 369, 1567–1568.
- Berger, T., Schnitzer, J., Orkand, P.M., and Kettenmann, H. (1992). Sodium and Calcium Currents in Glial Cells of the Mouse Corpus Callosum Slice. *Eur. J. Neurosci.* 4, 1271–1284.
- Berthet, C., Lei, H., Thevenet, J., Gruetter, R., Magistretti, P.J., and Hirt, L. (2009). Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1780–1789.
- Berthier, A., Lemaire-Ewing, S., Prunet, C., Monier, S., Athias, A., Bessède, G., Pais de Barros, J.-P., Laubriet, A., Gambert, P., Lizard, G., et al. (2004). Involvement of a calcium-dependent dephosphorylation of BAD associated with the localization of Trpc-1 within lipid rafts in 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 11, 897–905.
- Bertram, L., and Tanzi, R.E. (2004). The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients? *Pharmacol. Res.* 50, 385–396.
- Bezanilla, F. (2002). Voltage sensor movements. *J. Gen. Physiol.* 120, 465–473.
- Bezprozvanny, I., and Mattson, M.P. (2008). Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 31, 454–463.
- Bianchi, L., and Driscoll, M. (2006a). Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. *WormBook* 1–16.
- Biber, K., Owens, T., and Boddeke, E. (2014). What is microglia neurotoxicity (Not)? *Glia* 62, 841–854.

- Bien-Ly, N., Boswell, C.A., Jeet, S., Beach, T.G., Hoyte, K., Luk, W., Shihadeh, V., Ulufatu, S., Foreman, O., Lu, Y., et al. (2015). Lack of Widespread BBB Disruption in Alzheimer's Disease Models: Focus on Therapeutic Antibodies. *Neuron* 88, 289–297.
- Bionda, C., Portoukalian, J., Schmitt, D., Rodriguez-Lafrasse, C., and Ardail, D. (2004). Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem. J.* 382, 527–533.
- Birbes, H., Luberto, C., Hsu, Y.-T., El Bawab, S., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2005). A mitochondrial pool of sphingomyelin is involved in TNF α -induced Bax translocation to mitochondria. *Biochem. J.* 386, 445–451.
- Björkhem, I. (2006). Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J. Intern. Med.* 260, 493–508.
- Björkhem, I., and Diczfalusy, U. (2002). Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 734–742.
- Björkhem, I., and Meaney, S. (2004). Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 806–815.
- Bjorkhem, I., Andersson, U., Ellis, E., Alvelius, G., Ellegard, L., Diczfalusy, U., Sjoval, J., and Einarsson, C. (2001). From brain to bile. Evidence that conjugation and omega-hydroxylation are important for elimination of 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) in humans. *J. Biol. Chem.* 276, 37004–37010.
- Björkhem, I., Cedazo-Minguez, A., Leoni, V., and Meaney, S. (2009). Oxysterols and neurodegenerative diseases. *Mol. Aspects Med.* 30, 171–179.
- Björkhem, I., Lund, E., and Rudling, M. (1997). Coordinate regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and HMG-CoA reductase in the liver. *Subcell. Biochem.* 28, 23–55.
- Black, V.H. (1992). Cytochrome P450s in the guinea pig adrenal that are immunologically similar to liver forms: estrogen suppression explains male-female differences. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43, 863–868.
- Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R., and Bistoni, F. (1990a). Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J. Neuroimmunol.* 27, 229–237.
- Block, M.L., and Hong, J.-S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog. Neurobiol.* 76, 77–98.
- Block, M.L., Zecca, L., and Hong, J.-S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 57–69.
- Boda, E., Hoxha, E., Pini, A., Montarolo, F., and Tempia, F. (2012). Brain expression of Kv3 subunits during development, adulthood and aging and in a murine model of Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* 46, 606–615.

- Bodin, K., Bretillon, L., Aden, Y., Bertilsson, L., Broomé, U., Einarsson, C., and Diczfalusy, U. (2001). Antiepileptic drugs increase plasma levels of 4beta-hydroxycholesterol in humans: evidence for involvement of cytochrome p450 3A4. *J. Biol. Chem.* *276*, 38685–38689.
- Bogdanovic, N., Bretillon, L., Lund, E.G., Diczfalusy, U., Lannfelt, L., Winblad, B., Russell, D.W., and Björkhem, I. (2001). On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci. Lett.* *314*, 45–48.
- Boison, D., Büsow, H., D'Urso, D., Müller, H.W., and Stoffel, W. (1995). Adhesive properties of proteolipid protein are responsible for the compaction of CNS myelin sheaths. *J. Neurosci.* *15*, 5502–5513.
- Bordey, A., and Sontheimer, H. (2000). Ion channel expression by astrocytes in situ: comparison of different CNS regions. *Glia* *30*, 27–38.
- Bortone, D.S., Mitchell, K., and Manis, P.B. (2006). Developmental time course of potassium channel expression in the rat cochlear nucleus. *Hear. Res.* *211*, 114–125.
- Bosetti, F., Brizzi, F., Barogi, S., Mancuso, M., Siciliano, G., Tendi, E.A., Murri, L., Rapoport, S.I., and Solaini, G. (2002). Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *23*, 371–376.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol.* *1*, 213–216.
- Braak, H., and Braak, E. (1996). Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis. *Acta Neuropathol.* *92*, 197–201.
- Braak, H., de Vos, R.A., Jansen, E.N., Bratzke, H., and Braak, E. (1998). Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Prog. Brain Res.* *117*, 267–285.
- Bradl, M., and Lassmann, H. (2010). Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* *119*, 37–53.
- Bramblett, G.T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1992). Regions with abundant neurofibrillary pathology in human brain exhibit a selective reduction in levels of binding-competent tau and accumulation of abnormal tau-isoforms (A68 proteins). *Lab. Invest.* *66*, 212–222.
- Breckenridge, W.C., Gombos, G., and Morgan, I.G. (1972). The lipid composition of adult rat brain synaptosomal plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* *266*, 695–707.
- Brenna, J.T. (2002). Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* *5*, 127–132.
- Bretillon, L., Diczfalusy, U., Björkhem, I., Maire, M.A., Martine, L., Joffre, C., Acar, N., Bron, A., and Creuzot-Garcher, C. (2007). Cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) is specifically expressed in neurons of the neural retina. *Curr. Eye Res.* *32*, 361–366.

- Bretillon, L., Lütjohann, D., Stähle, L., Widhe, T., Bindl, L., Eggertsen, G., Diczfalusy, U., and Björkhem, I. (2000). Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface. *J. Lipid Res.* *41*, 840–845.
- Breuer, O., Dzeletovic, S., Lund, E., and Diczfalusy, U. (1996). The oxysterols cholest-5-ene-3 beta,4 alpha-diol, cholest-5-ene-3 beta,4 beta-diol and cholestane-3 beta,5 alpha,6 alpha-triol are formed during in vitro oxidation of low density lipoprotein, and are present in human atherosclerotic plaques. *Biochim. Biophys. Acta* *1302*, 145–152.
- Brice, A., Dubois, B., Agid, Y., Campion, D., Martinez, M., Clerger-Darpoux, F., Bellis, M., Mallet, J., Frebourg, T., Hannequin, D., et al. (1996). [Genetics of dominant autosomal forms of Alzheimer disease: 3 genes and one phenotype. Groupe de Recherche Français sur la Maladie d'Alzheimer]. *Rev. Neurol. (Paris)* *152*, 725–726.
- Brion, J.P., Couck, A.M., Passareiro, E., and Flament-Durand, J. (1985). Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J. Submicrosc. Cytol.* *17*, 89–96.
- Brites, P., Waterham, H.R., and Wanders, R.J.A. (2004). Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1636*, 219–231.
- Broom, D.C., Matson, D.J., Bradshaw, E., Buck, M.E., Meade, R., Coombs, S., Matchett, M., Ford, K.K., Yu, W., Yuan, J., et al. (2008). Characterization of N-(adamantan-1-ylmethyl)-5-[(3R-amino-pyrrolidin-1-yl)methyl]-2-chloro-benzamide, a P2X7 antagonist in animal models of pain and inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *327*, 620–633.
- Brown, A.J., and Jessup, W. (1999). Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* *142*, 1–28.
- Brown, M.R., El-Hassar, L., Zhang, Y., Alvaro, G., Large, C.H., and Kaczmarek, L.K. (2016). Physiological modulators of Kv3.1 channels adjust firing patterns of auditory brain stem neurons. *J. Neurophysiol.* *116*, 106–121.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1980). Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid Res.* *21*, 505–517.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2009). Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J. Lipid Res.* *50 Suppl*, S15-27.
- Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J.P., and Gibson, G.E. (2005). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Ann. Neurol.* *57*, 695–703.
- Buee, M., Rossignol, M., Jauneau, A., Ranjeva, R., and Bécard, G. (2000). The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol. Plant Microbe Interact.* *13*, 693–698.
- Burdge, G.C., and Calder, P.C. (2005). Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod. Nutr. Dev.* *45*, 581–597.

- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* 22, 183–192.
- Butterfield, D.A., Castegna, A., Lauderback, C.M., and Drake, J. (2002). Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol. Aging* 23, 655–664.
- 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.
- Cacabelos, R., Takeda, M., and Winblad, B. (1999). The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 14, 3–47.
- Cai, S.-Q., and Sesti, F. (2009). Oxidation of a potassium channel causes progressive sensory function loss during aging. *Nat. Neurosci.* 12, 611–617.
- Camby, I., Belot, N., Rorive, S., Lefranc, F., Maurage, C.A., Lahm, H., Kaltner, H., Hadari, Y., Ruchoux, M.M., Brotchi, J., et al. (2001). Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. *Brain Pathol.* 11, 12–26.
- Canevari, L., Abramov, A.Y., and Duchon, M.R. (2004). Toxicity of amyloid beta peptide: tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress. *Neurochem. Res.* 29, 637–650.
- Canu, N., Tufi, R., Serafino, A.L., Amadoro, G., Ciotti, M.T., and Calissano, P. (2005). Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 92, 1228–1242.
- Carré, J.-L., Goetz, B.D., O'Connor, L.T., Bremer, Q., and Duncan, I.D. (2002). Mutations in the rat myelin basic protein gene are associated with specific alterations in other myelin gene expression. *Neurosci. Lett.* 330, 17–20.
- Carson, M.J., Doose, J.M., Melchior, B., Schmid, C.D., and Ploix, C.C. (2006). CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol. Rev.* 213, 48–65.
- Carson, M.J., Thrash, J.C., and Walter, B. (2006). The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. *Clin Neurosci Res* 6, 237–245.
- Chandy, K.G. (1991). Simplified gene nomenclature. *Nature* 352, 26.
- Chang, J.Y., and Liu, L.Z. (1998). Neurotoxicity of cholesterol oxides on cultured cerebellar granule cells. *Neurochem. Int.* 32, 317–323.
- Chang, T.-Y., Li, B.-L., Chang, C.C.Y., and Urano, Y. (2009). Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferases. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E1-9.

- Chang, Y.H., Abdalla, D.S., and Sevanian, A. (1997). Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 202–214.
- Chatterjee, S. (1999). Neutral sphingomyelinase: past, present and future. *Chem. Phys. Lipids* 102, 79–96.
- Chaudhary, A.K., Reddy, G.R., Blair, I.A., and Marnett, L.J. (1996). Characterization of an N6-oxopropenyl-2'-deoxyadenosine adduct in malondialdehyde-modified DNA using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis* 17, 1167–1170.
- Chauhan, N.B., Lee, J.M., and Siegel, G.J. (1997). Na,K-ATPase mRNA levels and plaque load in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* 9, 151–166.
- Chauveau, F., Boutin, H., Van Camp, N., Thominiaux, C., Hantraye, P., Rivron, L., Marguet, F., Castel, M.-N., Rooney, T., Benavides, J., et al. (2011). In vivo imaging of neuroinflammation in the rodent brain with [11C]SSR180575, a novel indoleacetamide radioligand of the translocator protein (18 kDa). *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 38, 509–514.
- Chen, K., Thomas, S.R., and Keaney, J.F. (2003). Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 117–132.
- Cheng, H., Vetrivel, K.S., Gong, P., Meckler, X., Parent, A., and Thinakaran, G. (2007). Mechanisms of disease: new therapeutic strategies for Alzheimer's disease--targeting APP processing in lipid rafts. *Nat Clin Pract Neurol* 3, 374–382.
- Chiang, J.Y. (1998). Regulation of bile acid synthesis. *Front. Biosci.* 3, d176-193.
- Chin, L.S., Park, C.C., Zitnay, K.M., Sinha, M., DiPatri, A.J., Perillán, P., and Simard, J.M. (1997). 4-Aminopyridine causes apoptosis and blocks an outward rectifier K⁺ channel in malignant astrocytoma cell lines. *J. Neurosci. Res.* 48, 122–127.
- Chiu, S.Y., and Ritchie, J.M. (1980). Potassium channels in nodal and internodal axonal membrane of mammalian myelinated fibres. *Nature* 284, 170–171.
- Choi, E.K., Zaidi, N.F., Miller, J.S., Crowley, A.C., Merriam, D.E., Lilliehook, C., Buxbaum, J.D., and Wasco, W. (2001). Calsenilin is a substrate for caspase-3 that preferentially interacts with the familial Alzheimer's disease-associated C-terminal fragment of presenilin 2. *J. Biol. Chem.* 276, 19197–19204.
- Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 621S–629S.
- Chung, S., Lee, J., Joe, E.H., and Uhm, D.Y. (2001). Beta-amyloid peptide induces the expression of voltage dependent outward rectifying K⁺ channels in rat microglia. *Neurosci. Lett.* 300, 67–70.
- Chung, Y.H., Shin, C.M., Kim, M.J., and Cha, C.I. (2000). Immunohistochemical study on the distribution of six members of the Kv1 channel subunits in the rat basal ganglia. *Brain Res.* 875, 164–170.

- Cimini, A., Moreno, S., D'Amelio, M., Cristiano, L., D'Angelo, B., Falone, S., Benedetti, E., Carrara, P., Fanelli, F., Cecconi, F., et al. (2009). Early biochemical and morphological modifications in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a role for peroxisomes. *J. Alzheimers Dis.* *18*, 935–952.
- Citron, M. (2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 677–685.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1977). Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.* *116*, 227–247.
- Clinton, L.K., Blurton-Jones, M., Myczek, K., Trojanowski, J.Q., and LaFerla, F.M. (2010). Synergistic Interactions between Abeta, tau, and alpha-synuclein: acceleration of neuropathology and cognitive decline. *J. Neurosci.* *30*, 7281–7289.
- Coe, N.R., Smith, A.J., Frohnert, B.I., Watkins, P.A., and Bernlohr, D.A. (1999). The fatty acid transport protein (FATP1) is a very long chain acyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* *274*, 36300–36304.
- 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.* *8*, 67–74.
- Cole, G.M., and Frautschy, S.A. (2010). DHA may prevent age-related dementia. *J. Nutr.* *140*, 869–874.
- Colom, L.V., Diaz, M.E., Beers, D.R., Neely, A., Xie, W.J., and Appel, S.H. (1998). Role of potassium channels in amyloid-induced cell death. *J. Neurochem.* *70*, 1925–1934.
- Colombaioni, L., and Garcia-Gil, M. (2004). Sphingolipid metabolites in neural signalling and function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *46*, 328–355.
- Colvin, R.A., Bennett, J.W., and Colvin, S.L. (1991). Na(+)-Ca²⁺ exchange activity is increased in Alzheimer's disease brain tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *639*, 325–327.
- Conquer, J.A., and Holub, B.J. (1997). Dietary docosahexaenoic acid as a source of eicosapentaenoic acid in vegetarians and omnivores. *Lipids* *32*, 341–345.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* *17*, 1195–1214.
- Coppi, E., Cellai, L., Maraula, G., Dettori, I., Melani, A., Pugliese, A.M., and Pedata, F. (2015). Role of adenosine in oligodendrocyte precursor maturation. *Front Cell Neurosci* *9*, 155.
- Coppi, E., Cellai, L., Maraula, G., Pugliese, A.M., and Pedata, F. (2013a). Adenosine A_{2A} receptors inhibit delayed rectifier potassium currents and cell differentiation in primary purified oligodendrocyte cultures. *Neuropharmacology* *73*, 301–310.
- Coppi, E., Maraula, G., Fumagalli, M., Failli, P., Cellai, L., Bonfanti, E., Mazzoni, L.,

- Coppini, R., Abbracchio, M.P., Pedata, F., et al. (2013b). UDP-glucose enhances outward K(+) currents necessary for cell differentiation and stimulates cell migration by activating the GPR17 receptor in oligodendrocyte precursors. *Glia* 61, 1155–1171.
- Cotella, D., Hernandez-Enriquez, B., Wu, X., Li, R., Pan, Z., Leveille, J., Link, C.D., Oddo, S., and Sesti, F. (2012). Toxic role of K⁺ channel oxidation in mammalian brain. *J. Neurosci.* 32, 4133–4144.
- Cotrina, M.L., and Nedergaard, M. (2009). Physiological and pathological functions of P2X7 receptor in the spinal cord. *Purinergic Signal.* 5, 223–232.
- Coull, J.A.M., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., and De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438, 1017–1021.
- Craig, M.C., and Murphy, D.G.M. (2010). Estrogen therapy and Alzheimer's dementia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1205, 245–253.
- Crick, P.J., Griffiths, W.J., Zhang, J., Beibel, M., Abdel-Khalik, J., Kuhle, J., Sailer, A.W., and Wang, Y. (2016). Reduced Plasma Levels of 25-Hydroxycholesterol and Increased Cerebrospinal Fluid Levels of Bile Acid Precursors in Multiple Sclerosis Patients. *Mol. Neurobiol.*
- Crotti, A., and Ransohoff, R.M. (2016). Microglial Physiology and Pathophysiology: Insights from Genome-wide Transcriptional Profiling. *Immunity* 44, 505–515.
- Cunnane, S.C., Plourde, M., Pifferi, F., Bégin, M., Féart, C., and Barberger-Gateau, P. (2009). Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Prog. Lipid Res.* 48, 239–256.
- Cuvillier, O., Andrieu-Abadie, N., Ségui, B., Malagarie-Cazenave, S., Tardy, C., Bonhoure, E., and Levade, T. (2003). [Sphingolipid-mediated apoptotic signaling pathways]. *J. Soc. Biol.* 197, 217–221.
- D'Amelio, M., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., Diamantini, A., De Zio, D., Carrara, P., Battistini, L., et al. (2011a). Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 14, 69–76.
- D'Autréaux, B., and Toledano, M.B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 813–824.
- Dart, C. (2010). Lipid microdomains and the regulation of ion channel function. *J. Physiol. (Lond.)* 588, 3169–3178.
- Dartigues, J.-F., Helmer, C., Letenneur, L., Péres, K., Amieva, H., Auriacombe, S., Orgogozo, J.-M., Commenges, D., Jacqmin-Gadda, H., Richard-Harston, S., et al. (2012a). [Paquid 2012: illustration and overview]. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil* 10, 325–331.
- Dartigues, J.-F., Helmer, C., Letenneur, L., Péres, K., Amieva, H., Auriacombe, S., Orgogozo, J.-M., Commenges, D., Jacqmin-Gadda, H., Richard-Harston, S., et al. (2012b).

- [Paquid 2012: illustration and overview]. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil* 10, 325–331.
- Dasari, B., Prasanthi, J.R.P., Marwarha, G., Singh, B.B., and Ghribi, O. (2010). The oxysterol 27-hydroxycholesterol increases β -amyloid and oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. *BMC Ophthalmol* 10, 22.
- Dascal, N. (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22, 317–387.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752–758.
- Davies, M.J. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 761–770.
- Dawson, M.R.L., Polito, A., Levine, J.M., and Reynolds, R. (2003). NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 476–488.
- de Chaves, E.I., Rusiñol, A.E., Vance, D.E., Campenot, R.B., and Vance, J.E. (1997). Role of lipoproteins in the delivery of lipids to axons during axonal regeneration. *J. Biol. Chem.* 272, 30766–30773.
- De Lacoste, M.C., and White, C.L. (1993). The role of cortical connectivity in Alzheimer's disease pathogenesis: a review and model system. *Neurobiol. Aging* 14, 1–16.
- de Lores Arnaiz, G.R., and Ordieres, M.G.L. (2014). Brain Na(+), K(+)-ATPase Activity In Aging and Disease. *Int J Biomed Sci* 10, 85–102.
- de Medina, P., Paillasse, M.R., Segala, G., Al Saati, T., Boyes, J., Delsol, G., Allal, C., Marsili, S., Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2013). Technical note: Hapten synthesis, antibody production and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the natural steroidal alkaloid Dendrogenin A. *Biochimie* 95, 482–488.
- de Medina, P., Paillasse, M.R., Segala, G., Voisin, M., Mhamdi, L., Dalenc, F., Lacroix-Triki, M., Filleron, T., Pont, F., Saati, T.A., et al. (2013). Dendrogenin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differentiation and anti-tumour properties. *Nat Commun* 4, 1840.
- Dean, J.M., Moravec, M.D., Grafe, M., Abend, N., Ren, J., Gong, X., Volpe, J.J., Jensen, F.E., Hohimer, A.R., and Back, S.A. (2011). Strain-specific differences in perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Dev. Neurosci.* 33, 251–260.
- Debbabi, M., Nury, T., Zarrouk, A., Mekahli, N., Bezine, M., Sghaier, R., Grégoire, S., Martine, L., Durand, P., Camus, E., et al. (2016). Protective Effects of α -Tocopherol, γ -Tocopherol and Oleic Acid, Three Compounds of Olive Oils, and No Effect of Trolox, on 7-Ketocholesterol-Induced Mitochondrial and Peroxisomal Dysfunction in Microglial BV-2 Cells. *Int J Mol Sci* 17.

- Delacourte, A. (1999). Biochemical and molecular characterization of neurofibrillary degeneration in frontotemporal dementias. *Dement Geriatr Cogn Disord* 10 Suppl 1, 75–79.
- Delacourte, A., and Defossez, A. (1986). Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* 76, 173–186.
- Demetrius, L.A., Magistretti, P.J., and Pellerin, L. (2014). Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis and the Inverse Warburg effect. *Front Physiol* 5, 522.
- Desai, M.K., Guercio, B.J., Narrow, W.C., and Bowers, W.J. (2011). An Alzheimer's disease-relevant presenilin-1 mutation augments amyloid-beta-induced oligodendrocyte dysfunction. *Glia* 59, 627–640.
- Devaux, J., Alcaraz, G., Grinspan, J., Bennett, V., Joho, R., Crest, M., and Scherer, S.S. (2003). Kv3.1b is a novel component of CNS nodes. *J. Neurosci.* 23, 4509–4518.
- Devi, L., Prabhu, B.M., Galati, D.F., Avadhani, N.G., and Anandatheerthavarada, H.K. (2006). Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.* 26, 9057–9068.
- Díaz-Hernández, M., Díez-Zaera, M., Sánchez-Nogueiro, J., Gómez-Villafuertes, R., Canals, J.M., Alberch, J., Miras-Portugal, M.T., and Lucas, J.J. (2009). Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J.* 23, 1893–1906.
- Dickson, D.W. (1997). Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiol. Aging* 18, S21-26.
- Diestel, A., Aktas, O., Hackel, D., Hake, I., Meier, S., Raine, C.S., Nitsch, R., Zipp, F., and Ullrich, O. (2003). Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *J. Exp. Med.* 198, 1729–1740.
- Dietschy, J.M., and Turley, S.D. (2004). Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* 45, 1375–1397.
- Dizdaroglu, M. (1998). Facts about the artifacts in the measurement of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Free Radic. Res.* 29, 551–563.
- Donkin, J.J., Stukas, S., Hirsch-Reinshagen, V., Namjoshi, D., Wilkinson, A., May, S., Chan, J., Fan, J., Collins, J., and Wellington, C.L. (2010). ATP-binding cassette transporter A1 mediates the beneficial effects of the liver X receptor agonist GW3965 on object recognition memory and amyloid burden in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. *J. Biol. Chem.* 285, 34144–34154.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A., and Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 8, 1454–1468.

- Doyle, J.L., and Stubbs, L. (1998). Ataxia, arrhythmia and ion-channel gene defects. *Trends Genet.* *14*, 92–98.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* *82*, 47–95.
- Dröge, W. (2002). The plasma redox state and ageing. *Ageing Res. Rev.* *1*, 257–278.
- Duprat, F., Girard, C., Jarretou, G., and Lazdunski, M. (2005). Pancreatic two P domain K⁺ channels TALK-1 and TALK-2 are activated by nitric oxide and reactive oxygen species. *J. Physiol. (Lond.)* *562*, 235–244.
- Duran, M.J., Pierre, S.V., Lesnik, P., Pieroni, G., Bourdeaux, M., Dignat-Georges, F., Sampol, J., and Maixent, J.M. (2010). 7-ketocholesterol inhibits Na,K-ATPase activity by decreasing expression of its α 1-subunit and membrane fluidity in human endothelial cells. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)* *56 Suppl*, OL1434-1441.
- Duyckaerts, C., Hauw, J.J., Piette, F., Rainsard, C., Poulain, V., Berthaux, P., and Escourrolle, R. (1985). Cortical atrophy in senile dementia of the Alzheimer type is mainly due to a decrease in cortical length. *Acta Neuropathol.* *66*, 72–74.
- Dyer, R.G., Stewart, M.W., Mitcheson, J., George, K., Alberti, M.M., and Laker, M.F. (1997). 7-ketocholesterol, a specific indicator of lipoprotein oxidation, and malondialdehyde in non-insulin dependent diabetes and peripheral vascular disease. *Clin. Chim. Acta* *260*, 1–13.
- Edgar, N., and Sibille, E. (2012). A putative functional role for oligodendrocytes in mood regulation. *Transl Psychiatry* *2*, e109.
- Edwards, P.A., Kennedy, M.A., and Mak, P.A. (2002). LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascul. Pharmacol.* *38*, 249–256.
- Eichler, F., and Van Haren, K. (2007). Immune response in leukodystrophies. *Pediatr. Neurol.* *37*, 235–244.
- Elkabes, S., DiCicco-Bloom, E.M., and Black, I.B. (1996). Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J. Neurosci.* *16*, 2508–2521.
- Emery, B. (2010). Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science* *330*, 779–782.
- Engelen, M., Kemp, S., and Poll-The, B.-T. (2014). X-linked adrenoleukodystrophy: pathogenesis and treatment. *Curr Neurol Neurosci Rep* *14*, 486.
- Esiri, M.M. (2007). Ageing and the brain. *J. Pathol.* *211*, 181–187.
- Esiri, M.M., Wilcock, G.K., and Morris, J.H. (1997). Neuropathological assessment of the lesions of significance in vascular dementia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* *63*, 749–753.

- Espinosa, F., Marks, G., Heintz, N., and Joho, R.H. (2004). Increased motor drive and sleep loss in mice lacking Kv3-type potassium channels. *Genes Brain Behav.* 3, 90–100.
- Espinosa, F., McMahon, A., Chan, E., Wang, S., Ho, C.S., Heintz, N., and Joho, R.H. (2001b). Alcohol hypersensitivity, increased locomotion, and spontaneous myoclonus in mice lacking the potassium channels Kv3.1 and Kv3.3. *J. Neurosci.* 21, 6657–6665.
- Esposito, E., Rotilio, D., Di Matteo, V., Di Giulio, C., Cacchio, M., and Algeri, S. (2002). A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol. Aging* 23, 719–735.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., and Jürgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13, 341–390.
- Ettle, B., Schlachetzki, J.C.M., and Winkler, J. (2016a). Oligodendroglia and Myelin in Neurodegenerative Diseases: More Than Just Bystanders? *Mol. Neurobiol.* 53, 3046–3062.
- Eulenburg, V., and Gomeza, J. (2010). Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. *Brain Res Rev* 63, 103–112.
- Evans, W.J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 647S–52S.
- Eyo, U.B., and Wu, L.-J. (2013). Bidirectional microglia-neuron communication in the healthy brain. *Neural Plast.* 2013, 456857.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., Glass, C.K., Merrill, A.H., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W., Seyama, Y., Shaw, W., et al. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 46, 839–861.
- Fanelli, F., Sepe, S., D’Amelio, M., Bernardi, C., Cristiano, L., Cimini, A., Cecconi, F., Ceru, M.P., and Moreno, S. (2013). Age-dependent roles of peroxisomes in the hippocampus of a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Mol Neurodegener* 8, 8.
- Farr, R.L., Lismont, C., Terlecky, S.R., and Fransen, M. (2016). Peroxisome biogenesis in mammalian cells: The impact of genes and environment. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1049–1060.
- Feller, S.E. (2008). Acyl chain conformations in phospholipid bilayers: a comparative study of docosahexaenoic acid and saturated fatty acids. *Chem. Phys. Lipids* 153, 76–80.
- Feng, J.J., and Morest, D.K. (2006). Development of synapses and expression of a voltage-gated potassium channel in chick embryonic auditory nuclei. *Hear. Res.* 216–217, 116–126.
- Ferent, J., Ruat, M., and Traiffort, E. (2013). Investigation of the proteolipid protein promoter activity during demyelination and repair. *Differentiation* 85, 182–189.
- Fernstrom, J.D. (1999). Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on neuronal function.

Lipids 34, 161–169.

- Feutz, A.C., Pham-Dinh, D., Allinquant, B., Miehe, M., and Ghandour, M.S. (2001). An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway. *Glia* 34, 241–252.
- Figueroa, K.P., Waters, M.F., Garibyan, V., Bird, T.D., Gomez, C.M., Ranum, L.P.W., Minassian, N.A., Papazian, D.M., and Pulst, S.M. (2011). Frequency of KCNC3 DNA variants as causes of spinocerebellar ataxia 13 (SCA13). *PLoS ONE* 6, e17811.
- Filippov, V., Song, M.A., Zhang, K., Vinters, H.V., Tung, S., Kirsch, W.M., Yang, J., and Duerksen-Hughes, P.J. (2012). Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis.* 29, 537–547.
- Fillit, H., Ding, W.H., Buee, L., Kalman, J., Altstiel, L., Lawlor, B., and Wolf-Klein, G. (1991). Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 129, 318–320.
- Finkel, S.I., Costa e Silva, J., Cohen, G., Miller, S., and Sartorius, N. (1996). Behavioral and psychological signs and symptoms of dementia: a consensus statement on current knowledge and implications for research and treatment. *Int Psychogeriatr* 8 Suppl 3, 497–500.
- Finkel, T. (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 476, 52–54.
- Fitz, N.F., Cronican, A., Pham, T., Fogg, A., Fauq, A.H., Chapman, R., Lefterov, I., and Koldamova, R. (2010). Liver X receptor agonist treatment ameliorates amyloid pathology and memory deficits caused by high-fat diet in APP23 mice. *J. Neurosci.* 30, 6862–6872.
- Fordyce, C.B., Jagasia, R., Zhu, X., and Schlichter, L.C. (2005). Microglia Kv1.3 channels contribute to their ability to kill neurons. *J. Neurosci.* 25, 7139–7149.
- Forman, H.J., Maiorino, M., and Ursini, F. (2010). Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 49, 835–842.
- Forman, M.S., Lal, D., Zhang, B., Dabir, D.V., Swanson, E., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2005). Transgenic mouse model of tau pathology in astrocytes leading to nervous system degeneration. *J. Neurosci.* 25, 3539–3550.
- Förstl, H., and Kurz, A. (1999). Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249, 288–290.
- Franciosi, S., Ryu, J.K., Choi, H.B., Radov, L., Kim, S.U., and McLarnon, J.G. (2006). Broad-spectrum effects of 4-aminopyridine to modulate amyloid beta1-42-induced cell signaling and functional responses in human microglia. *J. Neurosci.* 26, 11652–11664.
- Fransen, M., Lismont, C., and Walton, P. (2017). The Peroxisome-Mitochondria Connection: How and Why? *Int J Mol Sci* 18.
- Fratiglioni, L., Launer, L.J., Andersen, K., Breteler, M.M., Copeland, J.R., Dartigues, J.F.,

- Lobo, A., Martinez-Lage, J., Soininen, H., and Hofman, A. (2000). Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54, S10-15.
- Frazzini, V., Guarnieri, S., Bomba, M., Navarra, R., Morabito, C., Marigliò, M.A., and Sensi, S.L. (2016). Altered Kv2.1 functioning promotes increased excitability in hippocampal neurons of an Alzheimer's disease mouse model. *Cell Death Dis* 7, e2100.
- Freund-Levi, Y., Eriksdotter-Jönhagen, M., Cederholm, T., Basun, H., Faxén-Irving, G., Garlind, A., Vedin, I., Vessby, B., Wahlund, L.-O., and Palmblad, J. (2006). Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: a randomized double-blind trial. *Arch. Neurol.* 63, 1402–1408.
- Frisardi, V., Panza, F., Seripa, D., Farooqui, T., and Farooqui, A.A. (2011). Glycerophospholipids and glycerophospholipid-derived lipid mediators: a complex meshwork in Alzheimer's disease pathology. *Prog. Lipid Res.* 50, 313–330.
- Fu, B.Y., Ma, S.L., Tang, N.L.S., Tam, C.W.C., Lui, V.W.C., Chiu, H.F.K., and Lam, L.C.W. (2009). Cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1) polymorphisms are associated with faster cognitive deterioration in Chinese older persons: a two-year follow up study. *Int J Geriatr Psychiatry* 24, 921–926.
- Fukuda, M., Kanou, F., Shimada, N., Sawabe, M., Saito, Y., Murayama, S., Hashimoto, M., Maruyama, N., and Ishigami, A. (2009). Elevated levels of 4-hydroxynonenal-histidine Michael adduct in the hippocampi of patients with Alzheimer's disease. *Biomed. Res.* 30, 227–233.
- Fukumoto, H., Deng, A., Irizarry, M.C., Fitzgerald, M.L., and Rebeck, G.W. (2002). Induction of the cholesterol transporter ABCA1 in central nervous system cells by liver X receptor agonists increases secreted Abeta levels. *J. Biol. Chem.* 277, 48508–48513.
- Fumagalli, M., Daniele, S., Lecca, D., Lee, P.R., Parravicini, C., Fields, R.D., Rosa, P., Antonucci, F., Verderio, C., Trincavelli, M.L., et al. (2011). Phenotypic changes, signaling pathway, and functional correlates of GPR17-expressing neural precursor cells during oligodendrocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 286, 10593–10604.
- Fünfschilling, U., Jockusch, W.J., Sivakumar, N., Möbius, W., Corthals, K., Li, S., Quintes, S., Kim, Y., Schaap, I.A.T., Rhee, J.-S., et al. (2012). Critical time window of neuronal cholesterol synthesis during neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 32, 7632–7645.
- 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.
- Gamper, N., Zaika, O., Li, Y., Martin, P., Hernandez, C.C., Perez, M.R., Wang, A.Y.C., Jaffe, D.B., and Shapiro, M.S. (2006). Oxidative modification of M-type K(+) channels as a mechanism of cytoprotective neuronal silencing. *EMBO J.* 25, 4996–5004.
- Gan, L., and Kaczmarek, L.K. (1998). When, where, and how much? Expression of the Kv3.1

- potassium channel in high-frequency firing neurons. *J. Neurobiol.* 37, 69–79.
- Gantner, F., Uhlig, S., and Wendel, A. (1995). Quinine inhibits release of tumor necrosis factor, apoptosis, necrosis and mortality in a murine model of septic liver failure. *Eur. J. Pharmacol.* 294, 353–355.
- Gaposchkin, D.P., and Zoeller, R.A. (1999). Plasmalogen status influences docosahexaenoic acid levels in a macrophage cell line. Insights using ether lipid-deficient variants. *J. Lipid Res.* 40, 495–503.
- Gawrisch, K., and Soubias, O. (2008). Structure and dynamics of polyunsaturated hydrocarbon chains in lipid bilayers-significance for GPCR function. *Chem. Phys. Lipids* 153, 64–75.
- Geillon, F., Trompier, D., Gondcaille, C., Lizard, G., and Savary, S. (2012). [Peroxisomal ABC transporters and X-linked adrenoleukodystrophy]. *Med Sci (Paris)* 28, 1087–1094.
- Gelissen, I.C., Harris, M., Rye, K.-A., Quinn, C., Brown, A.J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L., and Jessup, W. (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 534–540.
- Ghandour, M.S., Feutz, A.-C., Jalabi, W., Taleb, O., Bessert, D., Cypher, M., Carlock, L., and Skoff, R.P. (2002). Trafficking of PLP/DM20 and cAMP signaling in immortalized jimpy oligodendrocytes. *Glia* 40, 300–311.
- Ghosh, S., and Khare, S.K. (2016). Biodegradation of cytotoxic 7-Ketocholesterol by *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Bioresour. Technol.* 213, 44–49.
- Gibson Wood, W., Eckert, G.P., Igbavboa, U., and Müller, W.E. (2003). Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 281–290.
- Giordano, C.R., and Terlecky, S.R. (2012). Peroxisomes, cell senescence, and rates of aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1358–1362.
- Giudicessi, J.R., and Ackerman, M.J. (2012). Potassium-channel mutations and cardiac arrhythmias--diagnosis and therapy. *Nat Rev Cardiol* 9, 319–332.
- Glenner, G.G., Henry, J.H., and Fujihara, S. (1981). Congophilic angiopathy in the pathogenesis of Alzheimer's degeneration. *Ann Pathol* 1, 120–129.
- Göbel, K., Wedell, J.-H., Herrmann, A.M., Wachsmuth, L., Pankratz, S., Bittner, S., Budde, T., Kleinschnitz, C., Faber, C., Wiendl, H., et al. (2013). 4-Aminopyridine ameliorates mobility but not disease course in an animal model of multiple sclerosis. *Exp. Neurol.* 248, 62–71.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R.A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519–526.

- Goldman-Wohl, D.S., Chan, E., Baird, D., and Heintz, N. (1994). Kv3.3b: a novel Shaw type potassium channel expressed in terminally differentiated cerebellar Purkinje cells and deep cerebellar nuclei. *J. Neurosci.* *14*, 511–522.
- Gómez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J.H., Petersen, R.C., Parisi, J.E., and Hyman, B.T. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* *41*, 17–24.
- Gong, L.-W., Gao, T.M., Huang, H., Zhuang, Z.-Y., and Tong, Z. (2002). Transient forebrain ischemia induces persistent hyperactivity of large conductance Ca²⁺-activated potassium channels via oxidation modulation in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Eur. J. Neurosci.* *15*, 779–783.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G.A., and Klein, W.L. (2003). Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 10417–10422.
- Goñi, F.M., and Alonso, A. (2002). Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett.* *531*, 38–46.
- Good, T.A., Smith, D.O., and Murphy, R.M. (1996). Beta-amyloid peptide blocks the fast-inactivating K⁺ current in rat hippocampal neurons. *Biophys. J.* *70*, 296–304.
- Goodman, A.D., Brown, T.R., Krupp, L.B., Schapiro, R.T., Schwid, S.R., Cohen, R., Marinucci, L.N., Blight, A.R., and Fampridine MS-F203 Investigators (2009). Sustained-release oral fampridine in multiple sclerosis: a randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet* *373*, 732–738.
- Gorgas, K., Teigler, A., Komljenovic, D., and Just, W.W. (2006). The ether lipid-deficient mouse: tracking down plasmalogen functions. *Biochim. Biophys. Acta* *1763*, 1511–1526.
- Gosselet, F., Candela, P., Sevin, E., Berezowski, V., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2009). Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: use of an in vitro model. *Brain Res.* *1249*, 34–42.
- Green, R.C., Cupples, L.A., Go, R., Benke, K.S., Edeki, T., Griffith, P.A., Williams, M., Hipps, Y., Graff-Radford, N., Bachman, D., et al. (2002). Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. *JAMA* *287*, 329–336.
- Grissmer, S., Dethlefs, B., Wasmuth, J.J., Goldin, A.L., Gutman, G.A., Cahalan, M.D., and Chandy, K.G. (1990). Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 9411–9415.
- Grober, E., Hall, C.B., Lipton, R.B., Zonderman, A.B., Resnick, S.M., and Kawas, C. (2008). Memory impairment, executive dysfunction, and intellectual decline in preclinical Alzheimer's disease. *J Int Neuropsychol Soc* *14*, 266–278.
- Grønn, M., Christensen, E., Hagve, T.A., and Christophersen, B.O. (1991). Peroxisomal

- retroconversion of docosahexaenoic acid (22:6(n-3)) to eicosapentaenoic acid (20:5(n-3)) studied in isolated rat liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1081, 85–91.
- Grosclaude, M. (1997). *Psychothérapies des démences. Quels fondements ? Quels objectifs ?* (Montrouge: Editions John Libbey Eurotext).
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., George, L., Tung, Y.C., Kim, K.S., and Wisniewski, H.M. (1989). Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 2853–2857.
- Gu, Y., Barry, J., McDougel, R., Terman, D., and Gu, C. (2012). Alternative splicing regulates kv3.1 polarized targeting to adjust maximal spiking frequency. *J. Biol. Chem.* 287, 1755–1769.
- Guardiola, F., Codony, R., Addis, P.B., Rafecas, M., and Boatella, J. (1996). Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem. Toxicol.* 34, 193–211.
- Gudz, T.I., Schneider, T.E., Haas, T.A., and Macklin, W.B. (2002). Myelin proteolipid protein forms a complex with integrins and may participate in integrin receptor signaling in oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 22, 7398–7407.
- Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R., and Marbaix, G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233, 177–182.
- Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stühmer, W., et al. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 473–508.
- Gutteridge, D.L. (1993). The effect of variations in fibre length on the impact strength of poly(methyl methacrylate) resin reinforced with ultra-high-modulus polyethylene fibre. *Clin Mater* 12, 137–140.
- Haass, C., and Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101–112.
- Haghdoost-Yazdi, H., Faraji, A., Fraidouni, N., Movahedi, M., Hadibeygi, E., and Vaezi, F. (2011). Significant effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium in the treatment of 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 223, 70–74.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., and Chappelle, J.P. (2007). [Oxidative stress]. *Rev Med Liege* 62, 628–638.
- Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 531–542.
- Hamacher-Brady, A. (2012). Autophagy regulation and integration with cell signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 756–765.
- Hamblet, N.S., Ragland, B., Ali, M., Conyers, B., and Castora, F.J. (2006). Mutations in mitochondrial-encoded cytochrome c oxidase subunits I, II, and III genes detected in

- Alzheimer's disease using single-strand conformation polymorphism. *Electrophoresis* 27, 398–408.
- Hamby, M.E., and Sofroniew, M.V. (2010a). Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics* 7, 494–506.
- Hamilton, R.L. (2000). Lewy bodies in Alzheimer's disease: a neuropathological review of 145 cases using alpha-synuclein immunohistochemistry. *Brain Pathol.* 10, 378–384.
- Han, X., Holtzman, D.M., and McKeel, D.W. (2001a). Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Neurochem.* 77, 1168–1180.
- Handelmann, G.E., Boyles, J.K., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., and Pitas, R.E. (1992). Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J. Lipid Res.* 33, 1677–1688.
- Hansen, L., Salmon, D., Galasko, D., Masliah, E., Katzman, R., DeTeresa, R., Thal, L., Pay, M.M., Hofstetter, R., and Klauber, M. (1990). The Lewy body variant of Alzheimer's disease: a clinical and pathologic entity. *Neurology* 40, 1–8.
- Harbeby, E., Jouin, M., Alessandri, J.-M., Lallemand, M.-S., Linard, A., Laviaille, M., Huertas, A., Cunnane, S.C., and Guesnet, P. (2012). n-3 PUFA status affects expression of genes involved in neuroenergetics differently in the fronto-parietal cortex compared to the CA1 area of the hippocampus: effect of rest and neuronal activation in the rat. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 86, 211–220.
- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298–300.
- Hascalovici, J.R., Vaya, J., Khatib, S., Holcroft, C.A., Zukor, H., Song, W., Arvanitakis, Z., Bennett, D.A., and Schipper, H.M. (2009). Brain sterol dysregulation in sporadic AD and MCI: relationship to heme oxygenase-1. *J. Neurochem.* 110, 1241–1253.
- Hashimoto, T. (1996). Peroxisomal beta-oxidation: enzymology and molecular biology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804, 86–98.
- Hattori, N., Kitagawa, K., Higashida, T., Yagyu, K., Shimohama, S., Wataya, T., Perry, G., Smith, M.A., and Inagaki, C. (1998). CI-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase activities in Alzheimer's disease brains. *Neurosci. Lett.* 254, 141–144.
- Haughey, N.J. (2010). Sphingolipids in neurodegeneration. *Neuromolecular Med.* 12, 301–305.
- Hayashi, H., Campenot, R.B., Vance, D.E., and Vance, J.E. (2004). Glial lipoproteins stimulate axon growth of central nervous system neurons in compartmented cultures. *J. Biol. Chem.* 279, 14009–14015.

- Hebert, S.C., Mount, D.B., and Gamba, G. (2004). Molecular physiology of cation-coupled Cl⁻ cotransport: the SLC12 family. *Pflugers Arch.* 447, 580–593.
- Héja, L., Barabás, P., Nyitrai, G., Kékesi, K.A., Lasztóczy, B., Toke, O., Tárkányi, G., Madsen, K., Schousboe, A., Dobolyi, A., et al. (2009). Glutamate uptake triggers transporter-mediated GABA release from astrocytes. *PLoS ONE* 4, e7153.
- Henn, A., Lund, S., Hedtjárn, M., Schratzenholz, A., Pörzgen, P., and Leist, M. (2009a). The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX* 26, 83–94.
- Henrotin, Y.E., Bruckner, P., and Pujol, J.-P.L. (2003). The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* 11, 747–755.
- Hernández-Pineda, R., Chow, A., Amarillo, Y., Moreno, H., Saganich, M., Vega-Saenz de Miera, E.C., Hernández-Cruz, A., and Rudy, B. (1999). Kv3.1-Kv3.2 channels underlie a high-voltage-activating component of the delayed rectifier K⁺ current in projecting neurons from the globus pallidus. *J. Neurophysiol.* 82, 1512–1528.
- Herr, I., and Debatin, K.M. (2001). Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98, 2603–2614.
- Heverin, M., Bogdanovic, N., Lütjohann, D., Bayer, T., Pikuleva, I., Bretillon, L., Diczfalusy, U., Winblad, B., and Björkhem, I. (2004). Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.* 45, 186–193.
- Hinman, J.D., and Abraham, C.R. (2007). What's behind the decline? The role of white matter in brain aging. *Neurochem. Res.* 32, 2023–2031.
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R.L., Atwood, C.S., Johnson, A.B., Kress, Y., Vinters, H.V., Tabaton, M., et al. (2001). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 21, 3017–3023.
- Hirata-Fukae, C., Li, H.-F., Hoe, H.-S., Gray, A.J., Minami, S.S., Hamada, K., Niikura, T., Hua, F., Tsukagoshi-Nagai, H., Horikoshi-Sakuraba, Y., et al. (2008a). Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain Res.* 1216, 92–103.
- Hirrlinger, J., Resch, A., Gutterer, J.M., and Dringen, R. (2002). Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurones, astroglial and microglial cells. *J. Neurochem.* 82, 635–644.
- Hirsh, J.K., and Quandt, F.N. (1993). Aminopyridine block of potassium channels in mouse neuroblastoma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267, 604–611.
- Ho, J.K., Moser, H., Kishimoto, Y., and Hamilton, J.A. (1995). Interactions of a very long chain fatty acid with model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy. *J. Clin. Invest.* 96, 1455–1463.
- Holtzman, J.L. (2013). Cellular and animal models for high-throughput screening of therapeutic agents for the treatment of the diseases of the elderly in general and

- Alzheimer's disease in particular(†). *Front Pharmacol* 4, 59.
- Hong, H., Kim, B.S., and Im, H.-I. (2016a). Pathophysiological Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders. *Int Neurol J* 20, S2-7.
- Hong, J.H., Kang, J.W., Kim, D.K., Baik, S.H., Kim, K.H., Shanta, S.R., Jung, J.H., Mook-Jung, I., and Kim, K.P. (2016b). Global changes of phospholipids identified by MALDI imaging mass spectrometry in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Lipid*
- Horiuchi, M., Maezawa, I., Itoh, A., Wakayama, K., Jin, L.-W., Itoh, T., and Decarli, C. (2012). Amyloid β 1-42 oligomer inhibits myelin sheet formation in vitro. *Neurobiol. Aging* 33, 499–509.
- Hörster, F., Surtees, R., and Hoffmann, G.F. (2005). Disorders of intermediary metabolism: toxic leukoencephalopathies. *J. Inherit. Metab. Dis.* 28, 345–356.
- Hoshi, K., Tsukikawa, S., and Sato, A. (1991). Importance of Ca^{2+} , K^{+} and glucose in the medium for sperm penetration through the human zona pellucida. *Tohoku J. Exp. Med.* 165, 99–104.
- Hoshino, S., Kobayashi, S., Furukawa, T., Asakura, T., and Teramoto, A. (2003). Multiple immunostaining methods to detect traumatic axonal injury in the rat fluid-percussion brain injury model. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 43, 165–173; discussion 174.
- Hoyer, S. (2004). Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur. J. Pharmacol.* 490, 115–125.
- Hu, H., Shao, L.R., Chavoshy, S., Gu, N., Trieb, M., Behrens, R., Laake, P., Pongs, O., Knaus, H.G., Ottersen, O.P., et al. (2001). Presynaptic Ca^{2+} -activated K^{+} channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. *J. Neurosci.* 21, 9585–9597.
- Hua, X., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1996). Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell* 87, 415–426.
- Huang, H.-M., Ou, H.-C., Xu, H., Chen, H.-L., Fowler, C., and Gibson, G.E. (2003). Inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex promotes cytochrome c release from mitochondria, caspase-3 activation, and necrotic cell death. *J. Neurosci. Res.* 74, 309–317.
- Hughes, F.M., and Cidlowski, J.A. (1999). Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo. *Adv. Enzyme Regul.* 39, 157–171.
- Hulbert, A.J. (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J. Theor. Biol.* 234, 277–288.
- Hüttemann, M., Lee, I., Kreipke, C.W., and Petrov, T. (2008). Suppression of the inducible form of nitric oxide synthase prior to traumatic brain injury improves cytochrome c oxidase activity and normalizes cellular energy levels. *Neuroscience* 151, 148–154.

- Igarashi, M., Ma, K., Gao, F., Kim, H.-W., Rapoport, S.I., and Rao, J.S. (2011). Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer's disease prefrontal cortex. *J. Alzheimers Dis.* *24*, 507–517.
- Isacoff, E.Y., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1991). Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K⁺ channel. *Nature* *353*, 86–90.
- Ishikawa, K., Tanaka, M., Black, J.A., and Waxman, S.G. (1999). Changes in expression of voltage-gated potassium channels in dorsal root ganglion neurons following axotomy. *Muscle Nerve* *22*, 502–507.
- Itagaki, S., McGeer, P.L., Akiyama, H., Zhu, S., and Selkoe, D. (1989). Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J. Neuroimmunol.* *24*, 173–182.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* *13*, 45–53.
- Jahn, O., Tenzer, S., and Werner, H.B. (2009). Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. *Mol. Neurobiol.* *40*, 55–72.
- Jakob, R., and Kriegstein, J. (1997). Influence of flupirtine on a G-protein coupled inwardly rectifying potassium current in hippocampal neurones. *Br. J. Pharmacol.* *122*, 1333–1338.
- Janowski, B.A. (2002). The hypocholesterolemic agent LY295427 up-regulates INSIG-1, identifying the INSIG-1 protein as a mediator of cholesterol homeostasis through SREBP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 12675–12680.
- Jantaratnotai, N., Ryu, J.K., Kim, S.U., and McLarnon, J.G. (2003). Amyloid beta peptide-induced corpus callosum damage and glial activation in vivo. *Neuroreport* *14*, 1429–1433.
- Javitt, N.B., and Javitt, J.C. (2009). The retinal oxysterol pathway: a unifying hypothesis for the cause of age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* *20*, 151–157.
- Jiang, X., Sidhu, R., Porter, F.D., Yanjanin, N.M., Speak, A.O., te Vruchte, D.T., Platt, F.M., Fujiwara, H., Scherrer, D.E., Zhang, J., et al. (2011). A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma. *J. Lipid Res.* *52*, 1435–1445.
- Joffre, C., Leclère, L., Buteau, B., Martine, L., Cabaret, S., Malvitte, L., Acar, N., Lizard, G., Bron, A., Creuzot-Garcher, C., et al. (2007). Oxysterols induced inflammation and oxidation in primary porcine retinal pigment epithelial cells. *Curr. Eye Res.* *32*, 271–280.
- Johnson, R.C., and Shah, S.N. (1978). Cholesterol ester metabolizing enzymes in human brain: properties, subcellular distribution and relative levels in various diseased conditions. *J. Neurochem.* *31*, 895–902.

- Joseph, S.B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M.A., Collins, A.R., Laffitte, B.A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G.N., et al. (2002). Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7604–7609.
- Jun, G., Naj, A.C., Beecham, G.W., Wang, L.-S., Buross, J., Gallins, P.J., Buxbaum, J.D., Ertekin-Taner, N., Fallin, M.D., Friedland, R., et al. (2010). Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. *Arch. Neurol.* 67, 1473–1484.
- Jung, M., Sommer, I., Schachner, M., and Nave, K.A. (1996). Monoclonal antibody O10 defines a conformationally sensitive cell-surface epitope of proteolipid protein (PLP): evidence that PLP misfolding underlies dysmyelination in mutant mice. *J. Neurosci.* 16, 7920–7929.
- Kaasik, A., Rikk, T., Piirsoo, A., Zharkovsky, T., and Zharkovsky, A. (2005). Up-regulation of lysosomal cathepsin L and autophagy during neuronal death induced by reduced serum and potassium. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1023–1031.
- Katsel, P., Li, C., and Haroutunian, V. (2007). Gene expression alterations in the sphingolipid metabolism pathways during progression of dementia and Alzheimer's disease: a shift toward ceramide accumulation at the earliest recognizable stages of Alzheimer's disease? *Neurochem. Res.* 32, 845–856.
- Kemp, S., and Wanders, R. (2010). Biochemical aspects of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol.* 20, 831–837.
- Kempf, M., Clement, A., Faissner, A., Lee, G., and Brandt, R. (1996). Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J. Neurosci.* 16, 5583–5592.
- Kettenmann, H., and Schachner, M. (1985). Pharmacological properties of gamma-aminobutyric acid-, glutamate-, and aspartate-induced depolarizations in cultured astrocytes. *J. Neurosci.* 5, 3295–3301.
- Kettenmann, H., Banati, R., and Walz, W. (1993). Electrophysiological behavior of microglia. *Glia* 7, 93–101.
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., and Verkhratsky, A. (2013a). Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* 77, 10–18.
- Khalifa, S.A.M., de Medina, P., Erlandsson, A., El-Seedi, H.R., Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2014). The novel steroidal alkaloids dendrogenin A and B promote proliferation of adult neural stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 681–686.
- Khanna, R., Roy, L., Zhu, X., and Schlichter, L.C. (2001). K⁺ channels and the microglial respiratory burst. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 280, C796–806.
- Kikuchi, K., Sakai, K., Suzuki, T., and Takama, K. (1999). Fatty acid composition of choline and ethanolamine glycerophospholipid subclasses in heart tissue of mammals and migratory and demersal fish. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 124,

1–6.

- Kish, S.J., Bergeron, C., Rajput, A., Dozic, S., Mastrogiacomo, F., Chang, L.J., Wilson, J.M., DiStefano, L.M., and Nobrega, J.N. (1992). Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *59*, 776–779.
- Klein, W.L., Krafft, G.A., and Finch, C.E. (2001). Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci.* *24*, 219–224.
- Klugmann, M., Schwab, M.H., Pühlhofer, A., Schneider, A., Zimmermann, F., Griffiths, I.R., and Nave, K.A. (1997). Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* *18*, 59–70.
- Knowles, R.B., Wyart, C., Buldyrev, S.V., Cruz, L., Urbanc, B., Hasselmo, M.E., Stanley, H.E., and Hyman, B.T. (1999). Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 5274–5279.
- Koistinaho, M., Kettunen, M.I., Goldsteins, G., Keinänen, R., Salminen, A., Ort, M., Bures, J., Liu, D., Kauppinen, R.A., Higgins, L.S., et al. (2002). Beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse A beta deposits but do not form plaques show increased ischemic vulnerability: role of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 1610–1615.
- Kokkinidis, L., and Anisman, H. (1976). Dissociation of the effects of scopolamine and d-amphetamine on a spontaneous alternation task. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *5*, 293–297.
- Koldamova, R.P., Lefterov, I.M., Ikonovic, M.D., Skoko, J., Lefterov, P.I., Isanski, B.A., DeKosky, S.T., and Lazo, J.S. (2003). 22R-hydroxycholesterol and 9-cis-retinoic acid induce ATP-binding cassette transporter A1 expression and cholesterol efflux in brain cells and decrease amyloid beta secretion. *J. Biol. Chem.* *278*, 13244–13256.
- Koper, J.W., Zeinstra, E.C., Lopes-Cardozo, M., and van Golde, L.M. (1984a). Acetoacetate and glucose as substrates for lipid synthesis by rat brain oligodendrocytes and astrocytes in serum-free culture. *Biochim. Biophys. Acta* *796*, 20–26.
- Koschack, J., Lütjohann, D., Schmidt-Samoa, C., and Irle, E. (2009). Serum 24S-hydroxycholesterol and hippocampal size in middle-aged normal individuals. *Neurobiol. Aging* *30*, 898–902.
- Kotani, S., Sakaguchi, E., Warashina, S., Matsukawa, N., Ishikura, Y., Kiso, Y., Sakakibara, M., Yoshimoto, T., Guo, J., and Yamashima, T. (2006). Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neurosci. Res.* *56*, 159–164.
- Kotti, T.J., Ramirez, D.M.O., Pfeiffer, B.E., Huber, K.M., and Russell, D.W. (2006). Brain cholesterol turnover required for geranylgeraniol production and learning in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 3869–3874.
- Kou, J., Kovacs, G.G., Höftberger, R., Kulik, W., Brodde, A., Forss-Petter, S., Hönigschnabl, S., Gleiss, A., Brügger, B., Wanders, R., et al. (2011). Peroxisomal alterations in

- Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 122, 271–283.
- Kowalska, A. (2004). Genetic basis of neurodegeneration in familial Alzheimer's disease. *Pol J Pharmacol* 56, 171–178.
- Kraybill, M.L., Larson, E.B., Tsuang, D.W., Teri, L., McCormick, W.C., Bowen, J.D., Kukull, W.A., Leverenz, J.B., and Cherrier, M.M. (2005). Cognitive differences in dementia patients with autopsy-verified AD, Lewy body pathology, or both. *Neurology* 64, 2069–2073.
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312–318.
- Kuczynski, B., and Reo, N.V. (2006). Evidence that plasmalogen is protective against oxidative stress in the rat brain. *Neurochem. Res.* 31, 639–656.
- LaFerla, F.M., and Oddo, S. (2005). Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* 11, 170–176.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., et al. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6448–6453.
- Lang, P.A., Kaiser, S., Myssina, S., Wieder, T., Lang, F., and Huber, S.M. (2003). Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 285, C1553-1560.
- Langner, M., and Hui, S.W. (1993a). Merocyanine interaction with phosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1149, 175–179.
- Langosch, J.M., Gebicke-Haerter, P.J., Nörenberg, W., and Illes, P. (1994). Characterization and transduction mechanisms of purinoceptors in activated rat microglia. *Br. J. Pharmacol.* 113, 29–34.
- Lauderback, C.M., Hackett, J.M., Huang, F.F., Keller, J.N., Szweda, L.I., Markesbery, W.R., and Butterfield, D.A. (2001). The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of Abeta1-42. *J. Neurochem.* 78, 413–416.
- Lauritzen, I., De Weille, J.R., and Lazdunski, M. (1997). The potassium channel opener (-)-cromakalim prevents glutamate-induced cell death in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 69, 1570–1579.
- Lazarow, P.B., and De Duve, C. (1976). A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2043–2046.
- Lecca, D., Trincavelli, M.L., Gelosa, P., Sironi, L., Ciana, P., Fumagalli, M., Villa, G., Verderio, C., Grumelli, C., Guerrini, U., et al. (2008). The recently identified P2Y-like receptor GPR17 is a sensor of brain damage and a new target for brain repair. *PLoS ONE* 3, e3579.

- Lee, A.G. (2004). How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1666, 62–87.
- Lee, J.Y., and Hwang, D.H. (2002). Docosahexaenoic acid suppresses the activity of peroxisome proliferator-activated receptors in a colon tumor cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 667–674.
- Lee, S., Yoon, B.-E., Berglund, K., Oh, S.-J., Park, H., Shin, H.-S., Augustine, G.J., and Lee, C.J. (2010). Channel-mediated tonic GABA release from glia. *Science* 330, 790–796.
- Lemeignan, M., Millart, H., Lamiable, D., Molgo, J., and Lechat, P. (1984). Evaluation of 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine penetrability into cerebrospinal fluid in anesthetized rats. *Brain Res.* 304, 166–169.
- Leoni, V. (2009). Oxysterols as markers of neurological disease--a review. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 69, 22–25.
- Leoni, V., and Caccia, C. (2011). Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem. Phys. Lipids* 164, 515–524.
- Leoni, V., and Caccia, C. (2013). 24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. *Biochimie* 95, 595–612.
- Leoni, V., and Caccia, C. (2014). Study of cholesterol metabolism in Huntington's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 697–701.
- Leoni, V., Lütjohann, D., and Masterman, T. (2005). Levels of 7-oxocholesterol in cerebrospinal fluid are more than one thousand times lower than reported in multiple sclerosis. *J. Lipid Res.* 46, 191–195.
- Leoni, V., Nury, T., Vejux, A., Zarrouk, A., Caccia, C., Debbabi, M., Fromont, A., Sghaier, R., Moreau, T., and Lizard, G. (2017). Mitochondrial dysfunctions in 7-ketocholesterol-treated 158N oligodendrocytes without or with α -tocopherol: Impacts on the cellular profil of tricarboxylic cycle-associated organic acids, long chain saturated and unsaturated fatty acids, oxysterols, cholesterol and cholesterol precursors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 169, 96–110.
- Lesage, F., Lauritzen, I., Duprat, F., Reyes, R., Fink, M., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997). The structure, function and distribution of the mouse TWIK-1 K⁺ channel. *FEBS Lett.* 402, 28–32.
- Leung, G., Sun, W., Zheng, L., Brookes, S., Tully, M., and Shi, R. (2011). Anti-acrolein treatment improves behavioral outcome and alleviates myelin damage in experimental autoimmune encephalomyelitis mouse. *Neuroscience* 173, 150–155.
- Levade, T., Malagarie-Cazenave, S., Gouazé, V., Ségui, B., Tardy, C., Betito, S., Andrieu-Abadie, N., and Cuvillier, O. (2002). Ceramide in apoptosis: a revisited role. *Neurochem. Res.* 27, 601–607.
- Levine, R.L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 790–796.

- Li, F., and Tsien, J.Z. (2009). Memory and the NMDA receptors. *N. Engl. J. Med.* *361*, 302–303.
- Li, J.-J., Lu, J., Kaur, C., Sivakumar, V., Wu, C.-Y., and Ling, E.-A. (2008). Effects of hypoxia on expression of transforming growth factor-beta1 and its receptors I and II in the amoeboid microglial cells and murine BV-2 cells. *Neuroscience* *156*, 662–672.
- Li, R., and Singh, M. (2014). Sex differences in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol* *35*, 385–403.
- Li, X.-A., Everson, W.V., and Smart, E.J. (2005). Caveolae, lipid rafts, and vascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.* *15*, 92–96.
- Li, Y., Chu, L.-W., Wang, B., Yik, P.-Y., Huriletmuer, null, Jin, D.-Y., Ma, X., and Song, Y.-Q. (2010). CYP46A1 functional promoter haplotypes decipher genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* *21*, 1311–1323.
- Li, Y., Du, X.-F., Liu, C.-S., Wen, Z.-L., and Du, J.-L. (2012). Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Dev. Cell* *23*, 1189–1202.
- Liang, W.S., Reiman, E.M., Valla, J., Dunckley, T., Beach, T.G., Grover, A., Niedzielko, T.L., Schneider, L.E., Mastroeni, D., Caselli, R., et al. (2008). Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 4441–4446.
- Li-Hawkins, J., Lund, E.G., Bronson, A.D., and Russell, D.W. (2000a). Expression cloning of an oxysterol 7alpha-hydroxylase selective for 24-hydroxycholesterol. *J. Biol. Chem.* *275*, 16543–16549.
- Lim, D., Ronco, V., Grolla, A.A., Verkhatsky, A., and Genazzani, A.A. (2014). Glial calcium signalling in Alzheimer's disease. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *167*, 45–65.
- Lin, M.T., and Beal, M.F. (2006). Alzheimer's APP mangles mitochondria. *Nat. Med.* *12*, 1241–1243.
- Lindwall, G., and Cole, R.D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* *259*, 5301–5305.
- Linetti, A., Fratangeli, A., Taverna, E., Valnegri, P., Francolini, M., Cappello, V., Matteoli, M., Passafaro, M., and Rosa, P. (2010). Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. *J. Cell. Sci.* *123*, 595–605.
- Lismont, C., Nordgren, M., Van Veldhoven, P.P., and Fransen, M. (2015). Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Front Cell Dev Biol* *3*, 35.
- Liu, B., and Hannun, Y.A. (1997). Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione. *J. Biol. Chem.* *272*, 16281–16287.
- Liu, X., Wu, J.-Y., Zhou, F., Sun, X.-L., Yao, H.-H., Yang, Y., Ding, J.-H., and Hu, G. (2006). The regulation of rotenone-induced inflammatory factor production by ATP-sensitive potassium channel expressed in BV-2 cells. *Neurosci. Lett.* *394*, 131–135.

- Liu, Y., and Gutterman, D.D. (2002). Oxidative stress and potassium channel function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 305–311.
- Lizard, G., Monier, S., Cordelet, C., Gesquière, L., Deckert, V., Gueldry, S., Lagrost, L., and Gambert, P. (1999a). Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1190–1200.
- Lizard, G., Monier, S., Cordelet, C., Gesquière, L., Deckert, V., Gueldry, S., Lagrost, L., and Gambert, P. (1999b). Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1190–1200.
- Lizard, G., Monier, S., Cordelet, C., Gesquière, L., Deckert, V., Gueldry, S., Lagrost, L., and Gambert, P. (1999c). Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1190–1200.
- Lizard, G., Roignot, P., Maynadie, M., Lizard-Nacol, S., Poupon, M.F., and Bordes, M. (1995). Flow cytometry evaluation of the multidrug-resistant phenotype with functional tests involving uptake of daunorubicin, Hoechst 33342, or rhodamine 123: a comparative study. *Cancer Detect. Prev.* 19, 527–534.
- Lizard, G., Rouaud, O., Demarquoy, J., Cherkaoui-Malki, M., and Iuliano, L. (2012). Potential roles of peroxisomes in Alzheimer's disease and in dementia of the Alzheimer's type. *J. Alzheimers Dis.* 29, 241–254.
- Lømo, T. (2003). The discovery of long-term potentiation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 358, 617–620.
- Lovell, M.A., Gabbita, S.P., and Markesbery, W.R. (1999). Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *J. Neurochem.* 72, 771–776.
- Lund, E., Björkhem, I., Furster, C., and Wikvall, K. (1993). 24-, 25- and 27-hydroxylation of cholesterol by a purified preparation of 27-hydroxylase from pig liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1166, 177–182.
- Lund, E.G., Guileyardo, J.M., and Russell, D.W. (1999). cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7238–7243.
- Lund, E.G., Menke, J.G., and Sparrow, C.P. (2003). Liver X receptor agonists as potential therapeutic agents for dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1169–1177.
- Luneau, C.J., Williams, J.B., Marshall, J., Levitan, E.S., Oliva, C., Smith, J.S., Antanavage, J., Folander, K., Stein, R.B., and Swanson, R. (1991a). Alternative splicing contributes to K⁺ channel diversity in the mammalian central nervous system. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 3932–3936.
- Lustbader, J.W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H.W., Takuma, K., Wang, N., Caspersen, C., Chen, X., Pollak, S., Chaney, M., et al. (2004). ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304, 448–452.
- Lütjohann, D., Breuer, O., Ahlborg, G., Nennesmo, I., Sidén, A., Diczfalusy, U., and Björkhem, I. (1996). Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9799–9804.
- Lütjohann, D., Papassotiropoulos, A., Björkhem, I., Locatelli, S., Bagli, M., Oehring, R.D., Schlegel, U., Jessen, F., Rao, M.L., von Bergmann, K., et al. (2000). Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J. Lipid Res.* 41, 195–198.
- Luu, B. (1995). [From cholesterol to oxysterols. Current data]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 189, 827–837.
- Maeba, R., and Ueta, N. (2003). Ethanolamine plasmalogen and cholesterol reduce the total membrane oxidizability measured by the oxygen uptake method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 265–270.
- Magistretti, P.J. (2011). Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *Exp. Physiol.* 96, 407–410.
- Maher, P. (2006). Redox control of neural function: background, mechanisms, and significance. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1941–1970.
- Mahley, R.W. (2016). Central Nervous System Lipoproteins: ApoE and Regulation of Cholesterol Metabolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 1305–1315.
- Maioli, S., Båvner, A., Ali, Z., Heverin, M., Ismail, M.-A.-M., Puerta, E., Olin, M., Saeed, A., Shafaati, M., Parini, P., et al. (2013). Is it possible to improve memory function by upregulation of the cholesterol 24S-hydroxylase (CYP46A1) in the brain? *PLoS ONE* 8, e68534.
- Malin, S.A., Guo, W.X., Jafari, G., Goate, A.M., and Nerbonne, J.M. (1998). Presenilins upregulate functional K⁺ channel currents in mammalian cells. *Neurobiol. Dis.* 4, 398–409.
- Mandrekar-Colucci, S., and Landreth, G.E. (2011). Nuclear receptors as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Expert Opin. Ther. Targets* 15, 1085–1097.
- Mandybur, T.I., and Chuirazzi, C.C. (1990). Astrocytes and the plaques of Alzheimer's disease. *Neurology* 40, 635–639.
- Marchesini, N., and Hannun, Y.A. (2004). Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell Biol.* 82, 27–44.
- Marín-Teva, J.L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van Rooijen, N., and Mallat, M. (2004). Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41, 535–547.

- Marnier, L., Nyengaard, J.R., Tang, Y., and Pakkenberg, B. (2003). Marked loss of myelinated nerve fibers in the human brain with age. *J. Comp. Neurol.* 462, 144–152.
- Marnett, L.J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 424, 83–95.
- Marnett, L.J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 361–370.
- Marques, F., Sousa, J.C., Sousa, N., and Palha, J.A. (2013). Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 8, 38.
- Marsh, S.E., and Blurton-Jones, M. (2012). Examining the mechanisms that link β -amyloid and α -synuclein pathologies. *Alzheimers Res Ther* 4, 11.
- Martinet, W., De Bie, M., Schrijvers, D.M., De Meyer, G.R.Y., Herman, A.G., and Kockx, M.M. (2004). 7-ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 2296–2301.
- Masliah, E., Terry, R.D., Mallory, M., Alford, M., and Hansen, L.A. (1990). Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 137, 1293–1297.
- Matalon, S., Hardiman, K.M., Jain, L., Eaton, D.C., Kotlikoff, M., Eu, J.P., Sun, J., Meissner, G., and Stamler, J.S. (2003). Regulation of ion channel structure and function by reactive oxygen-nitrogen species. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 285, L1184-1189.
- Matés, J.M., Segura, J.M., Pérez-Gómez, C., Rosado, R., Olalla, L., Blanca, M., and Sánchez-Jiménez, F.M. (1999). Antioxidant enzymatic activities in human blood cells after an allergic reaction to pollen or house dust mite. *Blood Cells Mol. Dis.* 25, 103–109.
- Mattson, M.P., Cutler, R.G., and Jo, D.-G. (2005). Alzheimer peptides perturb lipid-regulating enzymes. *Nat. Cell Biol.* 7, 1045–1047.
- Mattsson, N., Carrillo, M.C., Dean, R.A., Devous, M.D., Nikolcheva, T., Pesini, P., Salter, H., Potter, W.Z., Sperling, R.S., Bateman, R.J., et al. (2015). Revolutionizing Alzheimer's disease and clinical trials through biomarkers. *Alzheimers Dement (Amst)* 1, 412–419.
- Mattsson, N., Insel, P.S., Nosheny, R., Tosun, D., Trojanowski, J.Q., Shaw, L.M., Jack, C.R., Donohue, M.C., Weiner, M.W., and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2014). Emerging β -amyloid pathology and accelerated cortical atrophy. *JAMA Neurol* 71, 725–734.
- Mauch, D.H., Nägler, K., Schumacher, S., Göritz, C., Müller, E.C., Otto, A., and Pfrieger, F.W. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294, 1354–1357.
- Maurer, I., Zierz, S., and Möller, H.J. (2000). A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol. Aging* 21, 455–462.

- Mayeux, R. (2010). Clinical practice. Early Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 2194–2201.
- Mazzuca, M., and Lesage, F. (2007). [Potassium channels, genetic and acquired diseases]. *Rev Med Interne* 28, 576–579.
- McEvoy, L., Schlegel, R.A., Williamson, P., and Del Buono, B.J. (1988). Merocyanine 540 as a flow cytometric probe of membrane lipid organization in leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 44, 337–344.
- McGeer, P.L., Akiyama, H., Kawamata, T., Yamada, T., Walker, D.G., and Ishii, T. (1992). Immunohistochemical localization of beta-amyloid precursor protein sequences in Alzheimer and normal brain tissue by light and electron microscopy. *J. Neurosci. Res.* 31, 428–442.
- McGowan, E., Eriksen, J., and Hutton, M. (2006). A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet.* 22, 281–289.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., and Stadlan, E.M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939–944.
- McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I., and Masters, C.L. (1999). Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 46, 860–866.
- McNamara, R.K., and Carlson, S.E. (2006). Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 75, 329–349.
- Medeiros, N., Dai, L., and Ferguson, A.V. (2012). Glucose-responsive neurons in the subfornical organ of the rat—a novel site for direct CNS monitoring of circulating glucose. *Neuroscience* 201, 157–165.
- Medina, J.H., and Izquierdo, I. (1995). Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 21, 185–194.
- Meier-Ruge, W., Ulrich, J., Brühlmann, M., and Meier, E. (1992). Age-related white matter atrophy in the human brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 673, 260–269.
- Meilandt, W.J., Yu, G.-Q., Chin, J., Roberson, E.D., Palop, J.J., Wu, T., Scearce-Levie, K., and Mucke, L. (2008). Enkephalin elevations contribute to neuronal and behavioral impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 28, 5007–5017.
- Mellon, E.A., Pilkinton, D.T., Clark, C.M., Elliott, M.A., Witschey, W.R., Borthakur, A., and Reddy, R. (2009). Sodium MR imaging detection of mild Alzheimer disease: preliminary study. *AJNR Am J Neuroradiol* 30, 978–984.
- Menn, B., Garcia-Verdugo, J.M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of

- the adult brain. *J. Neurosci.* 26, 7907–7918.
- Middlebrooks, J.C., Nick, H.S., Subramony, S.H., Advincula, J., Rosales, R.L., Lee, L.V., Ashizawa, T., and Waters, M.F. (2013). Mutation in the kv3.3 voltage-gated potassium channel causing spinocerebellar ataxia 13 disrupts sound-localization mechanisms. *PLoS ONE* 8, e76749.
- Mielke, M.M., and Haughey, N.J. (2012). Could plasma sphingolipids be diagnostic or prognostic biomarkers for Alzheimer’s disease? *Clin Lipidol* 7, 525–536.
- Migliore, L., Fontana, I., Colognato, R., Coppede, F., Siciliano, G., and Murri, L. (2005). Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer’s disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* 26, 587–595.
- Miki, T., Tashiro, F., Iwanaga, T., Nagashima, K., Yoshitomi, H., Aihara, H., Nitta, Y., Gonoi, T., Inagaki, N., Miyazaki, J. i, et al. (1997). Abnormalities of pancreatic islets by targeted expression of a dominant-negative KATP channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 11969–11973.
- Miller, C. (2000). An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* 1, REVIEWS0004.
- Miller, J.A., Woltjer, R.L., Goodenbour, J.M., Horvath, S., and Geschwind, D.H. (2013). Genes and pathways underlying regional and cell type changes in Alzheimer’s disease. *Genome Med* 5, 48.
- Molenaar, J.C. (2003). [From the library of the Netherlands Journal of Medicine. Rudolf Virchow: Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre; 1858]. *Ned Tijdschr Geneesk* 147, 2236–2244.
- Møller, I.M., Rogowska-Wrzesinska, A., and Rao, R.S.P. (2011). Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *J Proteomics* 74, 2228–2242.
- Montine, K.S., Kim, P.J., Olson, S.J., Markesbery, W.R., and Montine, T.J. (1997). 4-hydroxy-2-nonenal pyrrole adducts in human neurodegenerative disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 866–871.
- Montine, T.J., Markesbery, W.R., Zackert, W., Sanchez, S.C., Roberts, L.J., and Morrow, J.D. (1999). The magnitude of brain lipid peroxidation correlates with the extent of degeneration but not with density of neuritic plaques or neurofibrillary tangles or with APOE genotype in Alzheimer’s disease patients. *Am. J. Pathol.* 155, 863–868.
- Moore, K.J., El Khoury, J., Medeiros, L.A., Terada, K., Geula, C., Luster, A.D., and Freeman, M.W. (2002). A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J. Biol. Chem.* 277, 47373–47379.
- Morgan, C., Colombres, M., Nuñez, M.T., and Inestrosa, N.C. (2004). Structure and function of amyloid in Alzheimer’s disease. *Prog. Neurobiol.* 74, 323–349.
- Mórocz, M., Kálmán, J., Juhász, A., Sinkó, I., McGlynn, A.P., Downes, C.S., Janka, Z., and

- Raskó, I. (2002). Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 23, 47–53.
- Morris, M.C., and Tangney, C.C. (2014). Dietary fat composition and dementia risk. *Neurobiol. Aging* 35 Suppl 2, S59-64.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., and O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683.
- Mothet, J.P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O., Linden, D.J., Ferris, C.D., Rogawski, M.A., and Snyder, S.H. (2000). D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4926–4931.
- Moynagh, P.N. (2005). The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. *J. Anat.* 207, 265–269.
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.* 20, 4050–4058.
- Mukherjee, S., Zha, X., Tabas, I., and Maxfield, F.R. (1998). Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. *Biophys. J.* 75, 1915–1925.
- Mura, T., Dartigues, J.-F., and Berr, C. (2010). How many dementia cases in France and Europe? Alternative projections and scenarios 2010-2050. *Eur. J. Neurol.* 17, 252–259.
- Mutemberezi, V., Guillemot-Legris, O., and Muccioli, G.G. (2016). Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators. *Prog. Lipid Res.* 64, 152–169.
- Mutka, A.-L., Lusa, S., Linder, M.D., Jokitalo, E., Kopra, O., Jauhiainen, M., and Ikonen, E. (2004). Secretion of sterols and the NPC2 protein from primary astrocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 48654–48662.
- Nackerdien, Z., Rao, G., Cacciuttolo, M.A., Gajewski, E., and Dizdaroglu, M. (1991). Chemical nature of DNA-protein cross-links produced in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of iron or copper ions. *Biochemistry* 30, 4873–4879.
- Nagan, N., and Zoeller, R.A. (2001). Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog. Lipid Res.* 40, 199–229.
- Nagele, R.G., D'Andrea, M.R., Lee, H., Venkataraman, V., and Wang, H.-Y. (2003). Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res.* 971, 197–209.
- Nave, K.-A. (2010). Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468, 244–252.

- Neill, A.R., and Masters, C.J. (1973). Metabolism of fatty acids by ovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* *34*, 279–287.
- Nelson, J.A., Steckbeck, S.R., and Spencer, T.A. (1981). Biosynthesis of 24,25-epoxycholesterol from squalene 2,3;22,23-dioxide. *J. Biol. Chem.* *256*, 1067–1068.
- Nielsen, H.M., Ek, D., Avdic, U., Orbjörn, C., Hansson, O., Netherlands Brain Bank, Veerhuis, R., Rozemuller, A.J., Brun, A., Minthon, L., et al. (2013). NG2 cells, a new trail for Alzheimer's disease mechanisms? *Acta Neuropathol Commun* *1*, 7.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* *308*, 1314–1318.
- Noguchi, N., Saito, Y., and Urano, Y. (2014). Diverse functions of 24(S)-hydroxycholesterol in the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *446*, 692–696.
- Noguchi, N., Urano, Y., Takabe, W., and Saito, Y. (2015). New aspects of 24(S)-hydroxycholesterol in modulating neuronal cell death. *Free Radic. Biol. Med.* *87*, 366–372.
- Nörenberg, W., Appel, K., Bauer, J., Gebicke-Haerter, P.J., and Illes, P. (1993). Expression of an outwardly rectifying K⁺ channel in rat microglia cultivated on teflon. *Neurosci. Lett.* *160*, 69–72.
- Nourooz-Zadeh, J., Liu, E.H., Yhlen, B., Anggård, E.E., and Halliwell, B. (1999). F4-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *72*, 734–740.
- Nunez, M.T., and Glass, J. (1982). Reconstitution of the transferrin receptor in lipid vesicles. Effect of cholesterol on the binding of transferrin. *Biochemistry* *21*, 4139–4143.
- Nury, T., Zarrouk, A., Mackrill, J.J., Samadi, M., Durand, P., Riedinger, J.-M., Doria, M., Vejux, A., Limagne, E., Delmas, D., et al. (2015a). Induction of oxiaoptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7 β -hydroxycholesterol-, or 24(S)-hydroxycholesterol: Protective effects of α -tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3). *Steroids* *99*, 194–203.
- Nury, T., Zarrouk, A., Ragot, K., Debbabi, M., Riedinger, J.-M., Vejux, A., Aubourg, P., and Lizard, G. (2017). 7-Ketocholesterol is increased in the plasma of X-ALD patients and induces peroxisomal modifications in microglial cells: Potential roles of 7-ketocholesterol in the pathophysiology of X-ALD. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *169*, 123–136.
- Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S., and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci.* *29*, 547–553.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003a). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* *39*, 409–421.
- Ogishima, T., Deguchi, S., and Okuda, K. (1987). Purification and characterization of

- cholesterol 7 alpha-hydroxylase from rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* *262*, 7646–7650.
- Ohnishi, T., Yanazawa, M., Sasahara, T., Kitamura, Y., Hiroaki, H., Fukazawa, Y., Kii, I., Nishiyama, T., Kakita, A., Takeda, H., et al. (2015). Na, K-ATPase $\alpha 3$ is a death target of Alzheimer patient amyloid- β assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *112*, E4465-4474.
- Ohtsuki, S., Ito, S., Matsuda, A., Hori, S., Abe, T., and Terasaki, T. (2007). Brain-to-blood elimination of 24S-hydroxycholesterol from rat brain is mediated by organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) at the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* *103*, 1430–1438.
- Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., and Slotte, J.P. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* *41*, 66–97.
- Okado-Matsumoto, A., and Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* *276*, 38388–38393.
- Olabarria, M., Noristani, H.N., Verkhatsky, A., and Rodríguez, J.J. (2010a). Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia* *58*, 831–838.
- Olkkonen, V.M., and Hynynen, R. (2009). Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Mol. Aspects Med.* *30*, 123–133.
- Olsen, B.N., Schlesinger, P.H., Ory, D.S., and Baker, N.A. (2012). Side-chain oxysterols: from cells to membranes to molecules. *Biochim. Biophys. Acta* *1818*, 330–336.
- Opii, W.O., Joshi, G., Head, E., Milgram, N.W., Muggenburg, B.A., Klein, J.B., Pierce, W.M., Cotman, C.W., and Butterfield, D.A. (2008). Proteomic identification of brain proteins in the canine model of human aging following a long-term treatment with antioxidants and a program of behavioral enrichment: relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *29*, 51–70.
- Ormerod, M.G., Sun, X.M., Brown, D., Snowden, R.T., and Cohen, G.M. (1993). Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta Oncol* *32*, 417–424.
- Ory, D.S. (2004). Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home? *Circ. Res.* *95*, 660–670.
- Owen, J.B., Di Domenico, F., Sultana, R., Perluigi, M., Cini, C., Pierce, W.M., and Butterfield, D.A. (2009). Proteomics-determined differences in the concanavalin-A-fractionated proteome of hippocampus and inferior parietal lobule in subjects with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: implications for progression of AD. *J. Proteome Res.* *8*, 471–482.
- Ozaita, A., Martone, M.E., Ellisman, M.H., and Rudy, B. (2002). Differential subcellular localization of the two alternatively spliced isoforms of the Kv3.1 potassium channel subunit in brain. *J. Neurophysiol.* *88*, 394–408.

- Packer, L. (1997). Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci* 15, 353–363.
- Pal, S., Hartnett, K.A., Nerbonne, J.M., Levitan, E.S., and Aizenman, E. (2003). Mediation of neuronal apoptosis by Kv2.1-encoded potassium channels. *J. Neurosci.* 23, 4798–4802.
- Pal, S., He, K., and Aizenman, E. (2004). Nitrosative stress and potassium channel-mediated neuronal apoptosis: is zinc the link? *Pflugers Arch.* 448, 296–303.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Ruiz, C., Gredilla, R., Herrero, A., and Barja, G. (2000). Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech. Ageing Dev.* 112, 169–183.
- Pannaccione, A., Boscia, F., Scorziello, A., Adornetto, A., Castaldo, P., Sirabella, R., Tagliatalata, M., Di Renzo, G.F., and Annunziato, L. (2007). Up-regulation and increased activity of KV3.4 channels and their accessory subunit MinK-related peptide 2 induced by amyloid peptide are involved in apoptotic neuronal death. *Mol. Pharmacol.* 72, 665–673.
- Panzenboeck, U., Balazs, Z., Sovic, A., Hrzenjak, A., Levak-Frank, S., Wintersperger, A., Malle, E., and Sattler, W. (2002). ABCA1 and scavenger receptor class B, type I, are modulators of reverse sterol transport at an in vitro blood-brain barrier constituted of porcine brain capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 42781–42789.
- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., et al. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456–1458.
- Papassotiropoulos, A., Lütjohann, D., Bagli, M., Locatelli, S., Jessen, F., Rao, M.L., Maier, W., Björkhem, I., von Bergmann, K., and Heun, R. (2000). Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. *Neuroreport* 11, 1959–1962.
- Parameshwaran-Iyer, S., Carr, C.E., and Perney, T.M. (2003). Localization of KCNC1 (Kv3.1) potassium channel subunits in the avian auditory nucleus magnocellularis and nucleus laminaris during development. *J. Neurobiol.* 55, 165–178.
- Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jęftinija, K., Jęftinija, S., and Haydon, P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369, 744–747.
- Patel, A.J., and Lazdunski, M. (2004). The 2P-domain K⁺ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflugers Arch.* 448, 261–273.
- Patel, R.P., Diczfalusy, U., Dzeletovic, S., Wilson, M.T., and Darley-Usmar, V.M. (1996). Formation of oxysterols during oxidation of low density lipoprotein by peroxynitrite, myoglobin, and copper. *J. Lipid Res.* 37, 2361–2371.
- Paul, S.M., Doherty, J.J., Robichaud, A.J., Belfort, G.M., Chow, B.Y., Hammond, R.S., Crawford, D.C., Linsenbardt, A.J., Shu, H.-J., Izumi, Y., et al. (2013). The major brain cholesterol metabolite 24(S)-hydroxycholesterol is a potent allosteric modulator of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurosci.* 33, 17290–17300.

- Pedruzzi, E., Guichard, C., Ollivier, V., Driss, F., Fay, M., Prunet, C., Marie, J.-C., Pouzet, C., Samadi, M., Elbim, C., et al. (2004). NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10703–10717.
- Pellerin, L. (2010). Food for thought: the importance of glucose and other energy substrates for sustaining brain function under varying levels of activity. *Diabetes Metab.* 36 *Suppl 3*, S59-63.
- Pelvig, D.P., Pakkenberg, H., Stark, A.K., and Pakkenberg, B. (2008). Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol. Aging* 29, 1754–1762.
- Peng, J., Jones, G.L., and Watson, K. (2000). Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1598–1606.
- Perez-Neut, M., Haar, L., Rao, V., Santha, S., Lansu, K., Rana, B., Jones, W.K., and Gentile, S. (2016). Activation of hERG3 channel stimulates autophagy and promotes cellular senescence in melanoma. *Oncotarget* 7, 21991–22004.
- Perney, T.M., and Kaczmarek, L.K. (1997). Localization of a high threshold potassium channel in the rat cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 386, 178–202.
- Perney, T.M., Marshall, J., Martin, K.A., Hockfield, S., and Kaczmarek, L.K. (1992). Expression of the mRNAs for the Kv3.1 potassium channel gene in the adult and developing rat brain. *J. Neurophysiol.* 68, 756–766.
- Perry, E.K., Perry, R.H., Tomlinson, B.E., Blessed, G., and Gibson, P.H. (1980). Coenzyme A-acetylating enzymes in Alzheimer's disease: possible cholinergic "compartment" of pyruvate dehydrogenase. *Neurosci. Lett.* 18, 105–110.
- Peters, A. (1964). OBSERVATIONS ON THE CONNEXIONS BETWEEN MYELIN SHEATHS AND GLIAL CELLS IN THE OPTIC NERVES OF YOUNG RATS. *J. Anat.* 98, 125–134.
- 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.
- Petzold, G.C., and Murthy, V.N. (2011). Role of astrocytes in neurovascular coupling. *Neuron* 71, 782–797.
- Pfriefer, F.W. (2003). Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1158–1171.
- Phan, H.T.T., Hata, T., Morita, M., Yoda, T., Hamada, T., Vestergaard, M.C., and Takagi, M. (2013). The effect of oxysterols on the interaction of Alzheimer's amyloid beta with model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 2487–2495.
- Pihlaja, R., Koistinaho, J., Malm, T., Sikkilä, H., Vainio, S., and Koistinaho, M. (2008). Transplanted astrocytes internalize deposited beta-amyloid peptides in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Glia* 56, 154–163.

- Pinter, M.J., Waldeck, R.F., Cope, T.C., and Cork, L.C. (1997). Effects of 4-aminopyridine on muscle and motor unit force in canine motor neuron disease. *J. Neurosci.* *17*, 4500–4507.
- Platas, J., Guillén, M.I., del Caz, M.D.P., Gomar, F., Mirabet, V., and Alcaraz, M.J. (2013). Conditioned media from adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells downregulate degradative mediators induced by interleukin-1 β in osteoarthritic chondrocytes. *Mediators Inflamm.* *2013*, 357014.
- Pocock, J.M., and Kettenmann, H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* *30*, 527–535.
- Polazzi, E., and Monti, B. (2010). Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. *Prog. Neurobiol.* *92*, 293–315.
- Polidori, M.C., Stahl, W., Eichler, O., Niestroj, I., and Sies, H. (2001). Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* *30*, 456–462.
- Poorkaj, P., Sharma, V., Anderson, L., Nemens, E., Alonso, M.E., Orr, H., White, J., Heston, L., Bird, T.D., and Schellenberg, G.D. (1998a). Missense mutations in the chromosome 14 familial Alzheimer's disease presenilin 1 gene. *Hum. Mutat.* *11*, 216–221.
- Poulopoulou, C., Markakis, I., Davaki, P., Tsaltas, E., Rombos, A., Hatzimanolis, A., and Vassilopoulos, D. (2010). Aberrant modulation of a delayed rectifier potassium channel by glutamate in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* *37*, 339–348.
- Powers, J.M., and Moser, H.W. (1998). Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions, and pathogenesis. *Brain Pathol.* *8*, 101–120.
- Prasanthi, J.R., Huls, A., Thomasson, S., Thompson, A., Schommer, E., and Ghribi, O. (2009). Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Neurodegener* *4*, 1.
- Prehn, J.H., Jordán, J., Ghadge, G.D., Preis, E., Galindo, M.F., Roos, R.P., Kriegelstein, J., and Miller, R.J. (1997). Ca²⁺ and reactive oxygen species in staurosporine-induced neuronal apoptosis. *J. Neurochem.* *68*, 1679–1685.
- Priller, J., Haas, C.A., Reddington, M., and Kreutzberg, G.W. (1995). Calcitonin gene-related peptide and ATP induce immediate early gene expression in cultured rat microglial cells. *Glia* *15*, 447–457.
- Prinz, M., and Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 300–312.
- Prunet, C., Lemaire-Ewing, S., Ménétrier, F., Néel, D., and Lizard, G. (2005). Activation of caspase-3-dependent and -independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death: a morphological and biochemical study. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* *19*, 311–326.
- Qiu, X., Chen, Y., and Zhou, M. (2001). Two point mutations in mitochondrial DNA of

- cytochrome c oxidase coexist with normal mtDNA in a patient with Alzheimer's disease. *Brain Res.* 893, 261–263.
- Qiu, Y.G., Shen, Y.Z., Huang, Z.J., Zhao, B.C., He, C.F., and Bi, C.L. (2001). [Comparative studies of mitochondrial DNA of T-type cytoplasmic male sterile lines and their maintainers in wheat]. *Yi Chuan Xue Bao* 28, 166–170.
- Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 329–344.
- Rabin, L.A., Paré, N., Saykin, A.J., Brown, M.J., Wishart, H.A., Flashman, L.A., and Santulli, R.B. (2009). Differential memory test sensitivity for diagnosing amnesic mild cognitive impairment and predicting conversion to Alzheimer's disease. *Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn* 16, 357–376.
- Ragot, K., Delmas, D., Athias, A., Nury, T., Baarine, M., and Lizard, G. (2011a). α -Tocopherol impairs 7-ketocholesterol-induced caspase-3-dependent apoptosis involving GSK-3 activation and Mcl-1 degradation on 158N murine oligodendrocytes. *Chem. Phys. Lipids* 164, 469–478.
- Ragot, K., Mackrill, J.J., Zarrouk, A., Nury, T., Aires, V., Jacquin, A., Athias, A., Pais de Barros, J.-P., Véjux, A., Riedinger, J.-M., et al. (2013). Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes. *Biochem. Pharmacol.* 86, 67–79.
- Raivich, G. (2005). Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends Neurosci.* 28, 571–573.
- Ramakrishnan, N., McClain, D.E., and Catravas, G.N. (1993). Membranes as sensitive targets in thymocyte apoptosis. *Int. J. Radiat. Biol.* 63, 693–701.
- Raman, I.M., and Bean, B.P. (1999). Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar Purkinje neurons. *J. Neurosci.* 19, 1663–1674.
- Ramaroson, H., Helmer, C., Barberger-Gateau, P., Letenneur, L., Dartigues, J.-F., and PAQUID (2003). [Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over: updated results of the PAQUID cohort]. *Rev. Neurol. (Paris)* 159, 405–411.
- Rangaraju, S., Gearing, M., Jin, L.-W., and Levey, A. (2015). Potassium channel Kv1.3 is highly expressed by microglia in human Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 44, 797–808.
- Ransohoff, R.M., and Cardona, A.E. (2010). The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* 468, 253–262.
- Rao, A.V., and Balachandran, B. (2002). Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. *Nutr Neurosci* 5, 291–309.
- Rapoport, S.I. (2002). Hydrogen magnetic resonance spectroscopy in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 1, 82.

- Rathi, R., Colenbrander, B., Bevers, M.M., and Gadella, B.M. (2001). Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol. Reprod.* *65*, 462–470.
- Readhead, C., Takasashi, N., Shine, H.D., Saavedra, R., Sidman, R., and Hood, L. (1990). Role of myelin basic protein in the formation of central nervous system myelin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *605*, 280–285.
- Reddy, J.K., and Hashimoto, T. (2001). Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu. Rev. Nutr.* *21*, 193–230.
- Reddy, P.H., and Beal, M.F. (2005). Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res. Brain Res. Rev.* *49*, 618–632.
- Reed, T., Perluigi, M., Sultana, R., Pierce, W.M., Klein, J.B., Turner, D.M., Coccia, R., Markesbery, W.R., and Butterfield, D.A. (2008). Redox proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild cognitive impairment: insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* *30*, 107–120.
- Refsgaard, H.H., Tsai, L., and Stadtman, E.R. (2000). Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 611–616.
- Reich, E.E., Markesbery, W.R., Roberts, L.J., Swift, L.L., Morrow, J.D., and Montine, T.J. (2001). Brain regional quantification of F-ring and D-/E-ring isoprostanes and neuroprostanes in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* *158*, 293–297.
- Reiman, E.M., Chen, K., Liu, X., Bandy, D., Yu, M., Lee, W., Ayutyanont, N., Keppler, J., Reeder, S.A., Langbaum, J.B.S., et al. (2009). Fibrillar amyloid-beta burden in cognitively normal people at 3 levels of genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 6820–6825.
- Rentero, C., Zech, T., Quinn, C.M., Engelhardt, K., Williamson, D., Grewal, T., Jessup, W., Harder, T., and Gaus, K. (2008). Functional implications of plasma membrane condensation for T cell activation. *PLoS ONE* *3*, e2262.
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* *14*, 2819–2830.
- Rettig, J., Wunder, F., Stocker, M., Lichtinghagen, R., Mastiaux, F., Beckh, S., Kues, W., Pedarzani, P., Schröter, K.H., and Ruppertsberg, J.P. (1992a). Characterization of a Shaw-related potassium channel family in rat brain. *EMBO J.* *11*, 2473–2486.
- Reznick, A.Z., and Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth. Enzymol.* *233*, 357–363.
- Rhodes, K.J., Carroll, K.I., Sung, M.A., Doliveira, L.C., Monaghan, M.M., Burke, S.L., Strassle, B.W., Buchwalder, L., Menegola, M., Cao, J., et al. (2004). KChIPs and Kv4 alpha subunits as integral components of A-type potassium channels in

- mammalian brain. *J. Neurosci.* 24, 7903–7915.
- Richter, C., Park, J.W., and Ames, B.N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6465–6467.
- Robert, P., Onyike, C.U., Leentjens, A.F.G., Dujardin, K., Aalten, P., Starkstein, S., Verhey, F.R.J., Yessavage, J., Clement, J.P., Drapier, D., et al. (2009). Proposed diagnostic criteria for apathy in Alzheimer's disease and other neuropsychiatric disorders. *Eur. Psychiatry* 24, 98–104.
- Roberts, B.R., Doecke, J.D., Rembach, A., Yévenes, L.F., Fowler, C.J., McLean, C.A., Lind, M., Volitakis, I., Masters, C.L., Bush, A.I., et al. (2016). Rubidium and potassium levels are altered in Alzheimer's disease brain and blood but not in cerebrospinal fluid. *Acta Neuropathol Commun* 4, 119.
- Rohan Walker, F., and Yirmiya, R. (2016). Microglia, physiology and behavior: A brief commentary. *Brain Behav. Immun.* 55, 1–5.
- Rosato-Siri, M.D., Zambello, E., Mutinelli, C., Garbati, N., Benedetti, R., Aldegheri, L., Graziani, F., Virginio, C., Alvaro, G., and Large, C.H. (2015). A Novel Modulator of Kv3 Potassium Channels Regulates the Firing of Parvalbumin-Positive Cortical Interneurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 354, 251–260.
- Roses, A.D. (1996). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A rapidly expanding field with medical and epidemiological consequences. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 802, 50–57.
- Rothe, M., Rudolf, K.-D., and Partecke, B.-D. (2006). [Long-term results following denervation of the wrist in patients with stages II and III SLAC-/SNAC-wrist]. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 38, 261–266.
- Rottensteiner, H., and Theodoulou, F.L. (2006). The ins and outs of peroxisomes: coordination of membrane transport and peroxisomal metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1527–1540.
- Roumier, A., Béchade, C., Poncer, J.-C., Smalla, K.-H., Tomasello, E., Vivier, E., Gundelfinger, E.D., Triller, A., and Bessis, A. (2004). Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J. Neurosci.* 24, 11421–11428.
- Rüdiger, M., Kolleck, I., Putz, G., Wauer, R.R., Stevens, P., and Rüstow, B. (1998). Plasmalogens effectively reduce the surface tension of surfactant-like phospholipid mixtures. *Am. J. Physiol.* 274, L143-148.
- Rüdiger, M., Tölle, A., Meier, W., and Rüstow, B. (2005). Naturally derived commercial surfactants differ in composition of surfactant lipids and in surface viscosity. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 288, L379-383.
- Rudy, B., and McBain, C.J. (2001). Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends Neurosci.* 24, 517–526.
- Rudy, B., Chow, A., Lau, D., Amarillo, Y., Ozaita, A., Saganich, M., Moreno, H., Nadal, M.S., Hernandez-Pineda, R., Hernandez-Cruz, A., et al. (1999). Contributions of Kv3 channels to neuronal excitability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868, 304–343.

- Rudy, B., Kentros, C., Weiser, M., Fruhling, D., Serodio, P., Vega-Saenz de Miera, E., Ellisman, M.H., Pollock, J.A., and Baker, H. (1992). Region-specific expression of a K⁺ channel gene in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 4603–4607.
- Russell, D.W. (2000). Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1529, 126–135.
- Russell, D.W. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 137–174.
- Russell, D.W., Halford, R.W., Ramirez, D.M.O., Shah, R., and Kotti, T. (2009). Cholesterol 24-hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 1017–1040.
- Saeed, A.A., Genové, G., Li, T., Lütjohann, D., Olin, M., Mast, N., Pikuleva, I.A., Crick, P., Wang, Y., Griffiths, W., et al. (2014). Effects of a disrupted blood-brain barrier on cholesterol homeostasis in the brain. *J. Biol. Chem.* 289, 23712–23722.
- Saganich, M.J., Schroeder, B.E., Galvan, V., Bredesen, D.E., Koo, E.H., and Heinemann, S.F. (2006). Deficits in synaptic transmission and learning in amyloid precursor protein (APP) transgenic mice require C-terminal cleavage of APP. *J. Neurosci.* 26, 13428–13436.
- Saijo, K., and Glass, C.K. (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 775–787.
- Saito, M., Benson, E.P., Saito, M., and Rosenberg, A. (1987). Metabolism of cholesterol and triacylglycerol in cultured chick neuronal cells, glial cells, and fibroblasts: accumulation of esterified cholesterol in serum-free culture. *J. Neurosci. Res.* 18, 319–325.
- Salmeen, A., and Barford, D. (2005). Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 560–577.
- Sampath, H., and Ntambi, J.M. (2005). Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 317–340.
- Sandhu, L.C., Warters, R.L., and Dethlefsen, L.A. (1985a). Fluorescence studies of Hoechst 33342 with supercoiled and relaxed plasmid pBR322 DNA. *Cytometry* 6, 191–194.
- Santacruz, K., Lewis, J., Spire, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., et al. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309, 476–481.
- Santos, L.E., Beckman, D., and Ferreira, S.T. (2016). Microglial dysfunction connects depression and Alzheimer's disease. *Brain Behav. Immun.* 55, 151–165.
- Santos, M.J., Kawada, M.E., Espeel, M., Figueroa, C., Alvarez, A., Hidalgo, U., and Metz, C. (1994). Characterization of human peroxisomal membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 24890–24896.
- Santos, M.J., Quintanilla, R.A., Toro, A., Grandy, R., Dinamarca, M.C., Godoy, J.A., and

- Inestrosa, N.C. (2005). Peroxisomal proliferation protects from beta-amyloid neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 280, 41057–41068.
- Sanz, J.M., Chiozzi, P., Ferrari, D., Colaianna, M., Idzko, M., Falzoni, S., Fellin, R., Trabace, L., and Di Virgilio, F. (2009). Activation of microglia by amyloid {beta} requires P2X7 receptor expression. *J. Immunol.* 182, 4378–4385.
- Sanz-Blasco, S., Valero, R.A., Rodríguez-Crespo, I., Villalobos, C., and Núñez, L. (2008). Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies Abeta oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs. *PLoS ONE* 3, e2718.
- Sastre, M., Walter, J., and Gentleman, S.M. (2008). Interactions between APP secretases and inflammatory mediators. *J Neuroinflammation* 5, 25.
- Savary, S., Trompier, D., Andréoletti, P., Le Borgne, F., Demarquoy, J., and Lizard, G. (2012). Fatty acids - induced lipotoxicity and inflammation. *Curr. Drug Metab.* 13, 1358–1370.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74, 691–705.
- Schaffer, J.E. (2002). Fatty acid transport: the roads taken. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E239-246.
- Schaur, R.J., Siems, W., Bresgen, N., and Eckl, P.M. (2015). 4-Hydroxy-nonenal-A Bioactive Lipid Peroxidation Product. *Biomolecules* 5, 2247–2337.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., et al. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2, 864–870.
- Schilling, T., Quandt, F.N., Cherny, V.V., Zhou, W., Heinemann, U., Decoursey, T.E., and Eder, C. (2000). Upregulation of Kv1.3 K(+) channels in microglia deactivated by TGF-beta. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 279, C1123-1134.
- Schlattner, U., Dolder, M., Wallimann, T., and Tokarska-Schlattner, M. (2001). Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. *J. Biol. Chem.* 276, 48027–48030.
- Schmid-Burgk, J.L., Chauhan, D., Schmidt, T., Ebert, T.S., Reinhardt, J., Endl, E., and Hornung, V. (2016). A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation. *J. Biol. Chem.* 291, 103–109.
- Schroepfer, G.J. (2000). Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* 80, 361–554.
- Schwid, S.R., Petrie, M.D., McDermott, M.P., Tierney, D.S., Mason, D.H., and Goodman, A.D. (1997). Quantitative assessment of sustained-release 4-aminopyridine for

- symptomatic treatment of multiple sclerosis. *Neurology* 48, 817–821.
- Segal, J.L., Thompson, J.F., and Tayek, J.A. (2007). Effects of long-term 4-aminopyridine therapy on glucose tolerance and glucokinetics in patients with spinal cord injury. *Pharmacotherapy* 27, 789–792.
- Sekirnjak, C., Martone, M.E., Weiser, M., Deerinck, T., Bueno, E., Rudy, B., and Ellisman, M. (1997). Subcellular localization of the K⁺ channel subunit Kv3.1b in selected rat CNS neurons. *Brain Res.* 766, 173–187.
- Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741–766.
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M.-L., Grognet, P., Bombois, S., Blum, D., Delacourte, A., Pasquier, F., Vanmechelen, E., et al. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics* 5, 207–224.
- Sesti, F. (2016). Oxidation of K(+) Channels in Aging and Neurodegeneration. *Aging Dis* 7, 130–135.
- Sesti, F., Liu, S., and Cai, S.-Q. (2010). Oxidation of potassium channels by ROS: a general mechanism of aging and neurodegeneration? *Trends Cell Biol.* 20, 45–51.
- Shah, N.H., and Aizenman, E. (2014). Voltage-gated potassium channels at the crossroads of neuronal function, ischemic tolerance, and neurodegeneration. *Transl Stroke Res* 5, 38–58.
- Shi, R., Zhang, Y., Shi, Y., Shi, S., and Jiang, L. (2012). Inhibition of peroxisomal β -oxidation by thioridazine increases the amount of VLCFAs and A β generation in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 528, 6–10.
- Shichiri, M., Adkins, Y., Ishida, N., Umeno, A., Shigeri, Y., Yoshida, Y., Fedor, D.M., Mackey, B.E., and Kelley, D.S. (2014). DHA concentration of red blood cells is inversely associated with markers of lipid peroxidation in men taking DHA supplement. *J Clin Biochem Nutr* 55, 196–202.
- Shin, R.-W., Kruck, T.P.A., Murayama, H., and Kitamoto, T. (2003). A novel trivalent cation chelator Feralex dissociates binding of aluminum and iron associated with hyperphosphorylated tau of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 961, 139–146.
- Shobab, L.A., Hsiung, G.-Y.R., and Feldman, H.H. (2005). Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 4, 841–852.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291–295.
- Sigel, E., Baur, R., Trube, G., Möhler, H., and Malherbe, P. (1990a). The effect of subunit composition of rat brain GABAA receptors on channel function. *Neuron* 5, 703–711.
- Simard, A.R., and Rivest, S. (2006). Neuroprotective properties of the innate immune system and bone marrow stem cells in Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* 11, 327–335.

- Simard, M., and Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129, 877–896.
- Simonian, N.A., and Coyle, J.T. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 83–106.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572.
- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G., and Simons, K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6460–6464.
- Simpson, J.E., Ince, P.G., Lace, G., Forster, G., Shaw, P.J., Matthews, F., Savva, G., Brayne, C., Wharton, S.B., and MRC Cognitive Function and Ageing Neuropathology Study Group (2010). Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol. Aging* 31, 578–590.
- Singh, H., Beckman, K., and Poulos, A. (1993). Exclusive localization in peroxisomes of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase and alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase in rat liver. *J. Lipid Res.* 34, 467–477.
- Singhrao, S.K., Neal, J.W., Piddlesden, S.J., and Newman, G.R. (1994). New immunocytochemical evidence for a neuronal/oligodendroglial origin for corpora amylacea. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20, 66–73.
- Siskind, L.J. (2005). Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 143–153.
- Skulachev, V.P. (1998). Possible role of reactive oxygen species in antiviral defense. *Biochemistry Mosc.* 63, 1438–1440.
- Smith, L.L., and Johnson, B.H. (1989). Biological activities of oxysterols. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 285–332.
- Söderberg, M., Edlund, C., Alafuzoff, I., Kristensson, K., and Dallner, G. (1992). Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type. *J. Neurochem.* 59, 1646–1653.
- Sodhi, R.K., and Singh, N. (2014). Liver X receptor agonist T0901317 reduces neuropathological changes and improves memory in mouse models of experimental dementia. *Eur. J. Pharmacol.* 732, 50–59.
- Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7–35.
- Soldano, A., and Hassan, B.A. (2014). Beyond pathology: APP, brain development and Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 27, 61–67.
- Soliven, B., Szuchet, S., Arnason, B.G., and Nelson, D.J. (1989). Expression and modulation of K⁺ currents in oligodendrocytes: possible role in myelinogenesis. *Dev. Neurosci.* 11, 118–131.

- Solomon, A., Leoni, V., Kivipelto, M., Besga, A., Oksengård, A.R., Julin, P., Svensson, L., Wahlund, L.-O., Andreasen, N., Winblad, B., et al. (2009). Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect brain volumes in patients without objective cognitive impairment but not in those with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* *462*, 89–93.
- Sommer, I., and Schachner, M. (1981). Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev. Biol.* *83*, 311–327.
- Son, Y., Chun, W., Ahn, Y.-T., Kim, K., Lee, C.-W., Kim, J.-M., Lee, C., and An, W.G. (2015). 7-Ketocholesterol induces the reduction of KCNMB1 in atherosclerotic blood vessels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *457*, 324–327.
- Spinney, L. (2014). Alzheimer's disease: The forgetting gene. *Nature* *510*, 26–28.
- Stansley, B., Post, J., and Hensley, K. (2012). A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* *9*, 115.
- Stecca, B., Southwood, C.M., Gragerov, A., Kelley, K.A., Friedrich, V.L., and Gow, A. (2000). The evolution of lipophilin genes from invertebrates to tetrapods: DM-20 cannot replace proteolipid protein in CNS myelin. *J. Neurosci.* *20*, 4002–4010.
- Stence, N., Waite, M., and Dailey, M.E. (2001). Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* *33*, 256–266.
- Steves, C.J., Spector, T.D., and Jackson, S.H.D. (2012). Ageing, genes, environment and epigenetics: what twin studies tell us now, and in the future. *Age Ageing* *41*, 581–586.
- Stiefel, K.M., Torben-Nielsen, B., and Coggan, J.S. (2013). Proposed evolutionary changes in the role of myelin. *Front Neurosci* *7*, 202.
- Stokin, G.B., Lillo, C., Falzone, T.L., Brusch, R.G., Rockenstein, E., Mount, S.L., Raman, R., Davies, P., Masliah, E., Williams, D.S., et al. (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* *307*, 1282–1288.
- Strazielle, N., and Ghersi-Egea, J.F. (2013). Physiology of blood-brain interfaces in relation to brain disposition of small compounds and macromolecules. *Mol. Pharm.* *10*, 1473–1491.
- Streit, W.J., Walter, S.A., and Pennell, N.A. (1999). Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.* *57*, 563–581.
- Strupp, M., Kalla, R., Glasauer, S., Wagner, J., Hüfner, K., Jahn, K., and Brandt, T. (2008). Aminopyridines for the treatment of cerebellar and ocular motor disorders. *Prog. Brain Res.* *171*, 535–541.
- Sturtz, L.A., Diekert, K., Jensen, L.T., Lill, R., and Culotta, V.C. (2001). A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J. Biol. Chem.* *276*, 38084–38089.

- Sultana, R., Boyd-Kimball, D., Poon, H.F., Cai, J., Pierce, W.M., Klein, J.B., Merchant, M., Markesbery, W.R., and Butterfield, D.A. (2006a). Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: an approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. *Neurobiol. Aging* 27, 1564–1576.
- Sultana, R., Perluigi, M., and Butterfield, D.A. (2006b). Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 2021–2037.
- Sun, Y., Yao, J., Kim, T.-W., and Tall, A.R. (2003). Expression of liver X receptor target genes decreases cellular amyloid beta peptide secretion. *J. Biol. Chem.* 278, 27688–27694.
- Swerdlow, R.H. (2007). Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 2, 347–359.
- Szalay, G., Martinecz, B., Lénárt, N., Környei, Z., Orsolits, B., Judák, L., Császár, E., Fekete, R., West, B.L., Katona, G., et al. (2016). Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nat Commun* 7, 11499.
- Szuchman, A., Aviram, M., Tamir, S., and Vaya, J. (2003). Cholesterol, linoleic acid or/and tyrosine yield different spectra of products when oxidized alone or in a mixture: studies in various oxidative systems. *Free Radic. Res.* 37, 1277–1288.
- Tabas, I. (2002). Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J. Clin. Invest.* 110, 905–911.
- Takao, T., Flint, N., Lee, L., Ying, X., Merrill, J., and Chandross, K.J. (2004). 17beta-estradiol protects oligodendrocytes from cytotoxicity induced cell death. *J. Neurochem.* 89, 660–673.
- Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Mercken, M., Yamaguchi, H., Sugihara, S., et al. (1998). Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9637–9641.
- Takemoto, Y., Suzuki, Y., Horibe, R., Shimozawa, N., Wanders, R.J.A., and Kondo, N. (2003). Gas chromatography/mass spectrometry analysis of very long chain fatty acids, docosahexaenoic acid, phytanic acid and plasmalogen for the screening of peroxisomal disorders. *Brain Dev.* 25, 481–487.
- Tan, S.L., and Child, T.J. (2002). In-vitro maturation of oocytes from unstimulated polycystic ovaries. *Reprod. Biomed. Online* 4 *Suppl 1*, 18–23.
- Tang, X.D., Garcia, M.L., Heinemann, S.H., and Hoshi, T. (2004). Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by altering cysteine-mediated calcium sensing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 171–178.
- Tang, Y., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., and Gundersen, H.J. (1997). Age-induced white matter changes in the human brain: a stereological investigation. *Neurobiol. Aging* 18, 609–615.

- Taylor, C.M., Marta, C.B., Claycomb, R.J., Han, D.K., Rasband, M.N., Coetzee, T., and Pfeiffer, S.E. (2004). Proteomic mapping provides powerful insights into functional myelin biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 4643–4648.
- Terry, R.D. (2000). Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *59*, 1118–1119.
- Terwel, D., Steffensen, K.R., Verghese, P.B., Kummer, M.P., Gustafsson, J.-Å., Holtzman, D.M., and Heneka, M.T. (2011). Critical role of astroglial apolipoprotein E and liver X receptor- α expression for microglial A β phagocytosis. *J. Neurosci.* *31*, 7049–7059.
- Testa, G., Staurengi, E., Zerbinati, C., Gargiulo, S., Iuliano, L., Giaccone, G., Fantò, F., Poli, G., Leonarduzzi, G., and Gamba, P. (2016). Changes in brain oxysterols at different stages of Alzheimer's disease: Their involvement in neuroinflammation. *Redox Biol* *10*, 24–33.
- Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* *58*, 1791–1800.
- Thompson, P.M., and Vinters, H.V. (2012). Pathologic lesions in neurodegenerative diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci* *107*, 1–40.
- Tian, G., Kong, Q., Lai, L., Ray-Chaudhury, A., and Lin, C.G. (2010). Increased expression of cholesterol 24S-hydroxylase results in disruption of glial glutamate transporter EAAT2 association with lipid rafts: a potential role in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *113*, 978–989.
- Tiwari-Woodruff, S., Beltran-Parrazal, L., Charles, A., Keck, T., Vu, T., and Bronstein, J. (2006). K⁺ channel KV3.1 associates with OSP/claudin-11 and regulates oligodendrocyte development. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *291*, C687–698.
- Tontonoz, P., and Mangelsdorf, D.J. (2003). Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol. Endocrinol.* *17*, 985–993.
- Torres, L., Danver, J., Ji, K., Miyauchi, J.T., Chen, D., Anderson, M.E., West, B.L., Robinson, J.K., and Tsirka, S.E. (2016). Dynamic microglial modulation of spatial learning and social behavior. *Brain Behav. Immun.* *55*, 6–16.
- Tramutola, A., Lanzillotta, C., Perluigi, M., and Butterfield, D.A. (2016). Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Res. Bull.*
- Tremblay, M.A., Acker, C.M., and Davies, P. (2010). Tau phosphorylated at tyrosine 394 is found in Alzheimer's disease tangles and can be a product of the Abl-related kinase. *Arg. J. Alzheimers Dis.* *19*, 721–733.
- Trompier, D., Gondcaille, C., Lizard, G., and Savary, S. (2014). Regulation of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2): focus on oxysterols and LXR antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *446*, 651–655.
- Trompier, D., Vejux, A., Zarrouk, A., Gondcaille, C., Geillon, F., Nury, T., Savary, S., and Lizard, G. (2014). Brain peroxisomes. *Biochimie* *98*, 102–110.

- Tsacopoulos, M., and Magistretti, P.J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* *16*, 877–885.
- Tsai, S.-J., Lin, C.-Y., Mong, M.-C., Ho, M.-W., and Yin, M.-C. (2010). s-Ethyl cysteine and s-propyl cysteine alleviate beta-amyloid induced cytotoxicity in nerve growth factor differentiated PC12 cells. *J. Agric. Food Chem.* *58*, 7104–7108.
- Urbanc, B., Cruz, L., Le, R., Sanders, J., Ashe, K.H., Duff, K., Stanley, H.E., Irizarry, M.C., and Hyman, B.T. (2002). Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid deposits in transgenic mice and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 13990–13995.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *39*, 44–84.
- Valla, J., Schneider, L., Niedzielko, T., Coon, K.D., Caselli, R., Sabbagh, M.N., Ahern, G.L., Baxter, L., Alexander, G., Walker, D.G., et al. (2006). Impaired platelet mitochondrial activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Mitochondrion* *6*, 323–330.
- Van Cauwenberghe, C., Van Broeckhoven, C., and Sleegers, K. (2016). The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genet. Med.* *18*, 421–430.
- van de Kraats, C., Killestein, J., Popescu, V., Rijkers, E., Vrenken, H., Lütjohann, D., Barkhof, F., Polman, C.H., and Teunissen, C.E. (2014). Oxysterols and cholesterol precursors correlate to magnetic resonance imaging measures of neurodegeneration in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* *20*, 412–417.
- van de Kraats, C., Killestein, J., Popescu, V., Rijkers, E., Vrenken, H., Lütjohann, D., Barkhof, F., Polman, C.H., and Teunissen, C.E. (2014). Oxysterols and cholesterol precursors correlate to magnetic resonance imaging measures of neurodegeneration in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* *20*, 412–417.
- Vanmierlo, T., Rutten, K., Dederen, J., Bloks, V.W., van Vark-van der Zee, L.C., Kuipers, F., Kiliaan, A., Blokland, A., Sijbrands, E.J.G., Steinbusch, H., et al. (2011b). Liver X receptor activation restores memory in aged AD mice without reducing amyloid. *Neurobiol. Aging* *32*, 1262–1272.
- Vargas, M.R., Johnson, D.A., Sirkis, D.W., Messing, A., and Johnson, J.A. (2008). Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* *28*, 13574–13581.
- Varnum, M.M., and Ikezu, T. (2012). The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* *60*, 251–266.
- Vaya, J., and Schipper, H.M. (2007). Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J. Neurochem.* *102*, 1727–1737.
- Veal, E., and Day, A. (2011). Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Antioxid. Redox*

Signal. 15, 147–151.

- Vega-Saenz de Miera, E., and Rudy, B. (1992). Modulation of K⁺ channels by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 1681–1687.
- Vejux, A., and Lizard, G. (2009). Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol. Aspects Med.* 30, 153–170.
- Vejux, A., Guyot, S., Montange, T., Riedinger, J.-M., Kahn, E., and Lizard, G. (2009). Phospholipidosis and down-regulation of the PI3-K/PDK-1/Akt signalling pathway are vitamin E inhibitable events associated with 7-ketocholesterol-induced apoptosis. *J. Nutr. Biochem.* 20, 45–61.
- Vejux, A., Malvitte, L., and Lizard, G. (2008). Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41, 545–556.
- Venkateswaran, A., Repa, J.J., Lobaccaro, J.M., Bronson, A., Mangelsdorf, D.J., and Edwards, P.A. (2000). Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J. Biol. Chem.* 275, 14700–14707.
- Verkhatsky, A., and Steinhäuser, C. (2000). Ion channels in glial cells. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 32, 380–412.
- Verkhatsky, A., Orkand, R.K., and Kettenmann, H. (1998). Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol. Rev.* 78, 99–141.
- Viola, A., and Gupta, N. (2007). Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 889–896.
- Vitvitsky, V.M., Garg, S.K., Keep, R.F., Albin, R.L., and Banerjee, R. (2012). Na⁺ and K⁺ ion imbalances in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1671–1681.
- Vukovic, J., Colditz, M.J., Blackmore, D.G., Ruitenber, M.J., and Bartlett, P.F. (2012). Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging. *J. Neurosci.* 32, 6435–6443.
- Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S., and Nabekura, J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J. Neurosci.* 29, 3974–3980.
- Walker, L.C., Pahnke, J., Madauss, M., Vogelgesang, S., Pahnke, A., Herbst, E.W., Stausske, D., Walther, R., Kessler, C., and Warzok, R.W. (2000). Apolipoprotein E4 promotes the early deposition of Abeta42 and then Abeta40 in the elderly. *Acta Neuropathol.* 100, 36–42.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539.
- Walsh, D.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Condron, M.M., and Teplow, D.B. (1997).

- Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol. Chem.* 272, 22364–22372.
- Walz, W. (2000). Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem. Int.* 36, 291–300.
- Walz, W., and Bekar, L.K. (2001). Ion channels in cultured microglia. *Microsc. Res. Tech.* 54, 26–33.
- Wang, J., Xiong, S., Xie, C., Markesbery, W.R., and Lovell, M.A. (2005). Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 93, 953–962.
- Wang, X., Su, B., Lee, H., Li, X., Perry, G., Smith, M.A., and Zhu, X. (2009). Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 29, 9090–9103.
- Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H., and Zhu, X. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 1240–1247.
- Wang, Y., Rogers, P.M., Su, C., Varga, G., Stayrook, K.R., and Burris, T.P. (2008). Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. *J. Biol. Chem.* 283, 26332–26339.
- Wang, Y., Rogers, P.M., Su, C., Varga, G., Stayrook, K.R., and Burris, T.P. (2008). Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. *J. Biol. Chem.* 283, 26332–26339.
- Warrington, A.E., Barbarese, E., and Pfeiffer, S.E. (1992). Stage specific, (O4+GalC-) isolated oligodendrocyte progenitors produce MBP+ myelin in vivo. *Dev. Neurosci.* 14, 93–97.
- Waszkielewicz, A.M., Gunia, A., Szkaradek, N., Słoczyńska, K., Krupińska, S., and Marona, H. (2013). Ion channels as drug targets in central nervous system disorders. *Curr. Med. Chem.* 20, 1241–1285.
- Wei, L., Xiao, A.Y., Jin, C., Yang, A., Lu, Z.Y., and Yu, S.P. (2004). Effects of chloride and potassium channel blockers on apoptotic cell shrinkage and apoptosis in cortical neurons. *Pflugers Arch.* 448, 325–334.
- 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.
- Weiser, M., Bueno, E., Sekirnjak, C., Martone, M.E., Baker, H., Hillman, D., Chen, S., Thornhill, W., Ellisman, M., and Rudy, B. (1995). The potassium channel subunit KV3.1b is localized to somatic and axonal membranes of specific populations of CNS neurons. *J. Neurosci.* 15, 4298–4314.
- Weiser, M., Vega-Saenz de Miera, E., Kentros, C., Moreno, H., Franzen, L., Hillman, D., Baker, H., and Rudy, B. (1994). Differential expression of Shaw-related K+ channels

- in the rat central nervous system. *J. Neurosci.* *14*, 949–972.
- Whelan, J., and Rust, C. (2006). Innovative dietary sources of n-3 fatty acids. *Annu. Rev. Nutr.* *26*, 75–103.
- Whitehead, T.P., Robinson, D., Allaway, S., Syms, J., and Hale, A. (1995). Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin. Chem.* *41*, 32–35.
- Whitney, K.D., Watson, M.A., Collins, J.L., Benson, W.G., Stone, T.M., Numerick, M.J., Tippin, T.K., Wilson, J.G., Winegar, D.A., and Kliewer, S.A. (2002). Regulation of cholesterol homeostasis by the liver X receptors in the central nervous system. *Mol. Endocrinol.* *16*, 1378–1385.
- Wickenden, A.D., Krajewski, J.L., London, B., Wagoner, P.K., Wilson, W.A., Clark, S., Roeloffs, R., McNaughton-Smith, G., and Rigdon, G.C. (2008). N-(6-chloro-pyridin-3-yl)-3,4-difluoro-benzamide (ICA-27243): a novel, selective KCNQ2/Q3 potassium channel activator. *Mol. Pharmacol.* *73*, 977–986.
- Wiegand, R.D., and Anderson, R.E. (1983). Phospholipid molecular species of frog rod outer segment membranes. *Exp. Eye Res.* *37*, 159–173.
- Williams, T.I., Lynn, B.C., Markesbery, W.R., and Lovell, M.A. (2006). Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *27*, 1094–1099.
- Williamson, A.V., Compston, D.A., and Randall, A.D. (1997). Analysis of the ion channel complement of the rat oligodendrocyte progenitor in a commonly studied in vitro preparation. *Eur. J. Neurosci.* *9*, 706–720.
- Williard, D.E., Harmon, S.D., Kaduce, T.L., Preuss, M., Moore, S.A., Robbins, M.E., and Spector, A.A. (2001). Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 polyunsaturated fatty acids in differentiated rat brain astrocytes. *J. Lipid Res.* *42*, 1368–1376.
- Willmott, N.J., Wong, K., and Strong, A.J. (2000). Intercellular Ca²⁺ waves in rat hippocampal slice and dissociated glial-neuron cultures mediated by nitric oxide. *FEBS Lett.* *487*, 239–247.
- Wiseman, H., and Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* *313* (Pt 1), 17–29.
- Wiśniewski, H., Terry, R.D., and Hirano, A. (1970). Neurofibrillary pathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *29*, 163–176.
- Wolf, Y., Yona, S., Kim, K.-W., and Jung, S. (2013). Microglia, seen from the CX3CR1 angle. *Front Cell Neurosci* *7*, 26.
- Wood, W.G., Schroeder, F., Igbavboa, U., Avdulov, N.A., and Chochina, S.V. (2002). Brain membrane cholesterol domains, aging and amyloid beta-peptides. *Neurobiol. Aging* *23*, 685–694.

- Wostyn, P., Van Dam, D., Audenaert, K., and De Deyn, P.P. (2011). Increased Cerebrospinal Fluid Production as a Possible Mechanism Underlying Caffeine's Protective Effect against Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* 2011, 617420.
- Wright, A.L., Zinn, R., Hohensinn, B., Konen, L.M., Beynon, S.B., Tan, R.P., Clark, I.A., Abdipranoto, A., and Vissel, B. (2013). Neuroinflammation and neuronal loss precede A β plaque deposition in the hAPP-J20 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 8, e59586.
- Wu, C.-Y., Kaur, C., Sivakumar, V., Lu, J., and Ling, E.-A. (2009). Kv1.1 expression in microglia regulates production and release of proinflammatory cytokines, endothelins and nitric oxide. *Neuroscience* 158, 1500–1508.
- Wu, K.W., Yang, P., Li, S.S., Liu, C.W., and Sun, F.Y. (2015). VEGF attenuated increase of outward delayed-rectifier potassium currents in hippocampal neurons induced by focal ischemia via PI3-K pathway. *Neuroscience* 298, 94–101.
- Wulff, H., Castle, N.A., and Pardo, L.A. (2009). Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 8, 982–1001.
- Wyss-Coray, T., and Rogers, J. (2012). Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006346.
- Wyss-Coray, T., Loike, J.D., Brionne, T.C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S.C., and Husemann, J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat. Med.* 9, 453–457.
- Xiao, Q., Yan, P., Ma, X., Liu, H., Perez, R., Zhu, A., Gonzales, E., Burchett, J.M., Schuler, D.R., Cirrito, J.R., et al. (2014). Enhancing astrocytic lysosome biogenesis facilitates A β clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. *J. Neurosci.* 34, 9607–9620.
- Xu, J., Chen, S., Ku, G., Ahmed, S.H., Xu, J., Chen, H., and Hsu, C.Y. (2001). Amyloid beta peptide-induced cerebral endothelial cell death involves mitochondrial dysfunction and caspase activation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 702–710.
- Yamada, M. (2004). Cerebral amyloid angiopathy and gene polymorphisms. *J. Neurol. Sci.* 226, 41–44.
- Yamamoto, H., Saitoh, Y., Fukunaga, K., Nishimura, H., and Miyamoto, E. (1988). Dephosphorylation of microtubule proteins by brain protein phosphatases 1 and 2A, and its effect on microtubule assembly. *J. Neurochem.* 50, 1614–1623.
- Yan, D., and Olkkonen, V.M. (2008). Characteristics of oxysterol binding proteins. *Int. Rev. Cytol.* 265, 253–285.
- Yanagi, M., Joho, R.H., Southcott, S.A., Shukla, A.A., Ghose, S., and Tamminga, C.A. (2014). Kv3.1-containing K(+) channels are reduced in untreated schizophrenia and normalized with antipsychotic drugs. *Mol. Psychiatry* 19, 573–579.
- Yang, L., Thomas, N.D., and Helke, C.J. (1996). Characterization of substance P release from the intermediate area of rat thoracic spinal cord. *Synapse* 23, 265–273.

- Yates, C.M., Butterworth, J., Tennant, M.C., and Gordon, A. (1990). Enzyme activities in relation to pH and lactate in postmortem brain in Alzheimer-type and other dementias. *J. Neurochem.* 55, 1624–1630.
- Ye, H., Jalini, S., Mylvaganam, S., and Carlen, P. (2010). Activation of large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels depresses basal synaptic transmission in the hippocampal CA1 area in APP (swe/ind) TgCRND8 mice. *Neurobiol. Aging* 31, 591–604.
- Yeagle, P.L. (1985). Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 822, 267–287.
- Yehuda, S., Rabinovitz, S., Carasso, R.L., and Mostofsky, D.I. (2002). The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol. Aging* 23, 843–853.
- Yen, S.H., Gaskin, F., and Fu, S.M. (1983). Neurofibrillary tangles in senile dementia of the Alzheimer type share an antigenic determinant with intermediate filaments of the vimentin class. *Am. J. Pathol.* 113, 373–381.
- Yin, H., Wang, H., Zhang, H., Gao, N., Zhang, T., and Yang, Z. (2017). Resveratrol Attenuates A β -Induced Early Hippocampal Neuron Excitability Impairment via Recovery of Function of Potassium Channels. *Neurotox Res.*
- Yirmiya, R., Rimmerman, N., and Reshef, R. (2015). Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci.* 38, 637–658.
- Yokoyama, S., Imoto, K., Kawamura, T., Higashida, H., Iwabe, N., Miyata, T., and Numa, S. (1989). Potassium channels from NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells. Primary structure and functional expression from cDNAs. *FEBS Lett.* 259, 37–42.
- Yoshikawa, T., Shimano, H., Yahagi, N., Ide, T., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., et al. (2002). Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J. Biol. Chem.* 277, 1705–1711.
- Yu, S.P., Yeh, C.H., Sensi, S.L., Gwag, B.J., Canzoniero, L.M., Farhangrazi, Z.S., Ying, H.S., Tian, M., Dugan, L.L., and Choi, D.W. (1997). Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* 278, 114–117.
- Zacchia, M., Abategiovanni, M.L., Stratigis, S., and Capasso, G. (2016). Potassium: From Physiology to Clinical Implications. *Kidney Dis (Basel)* 2, 72–79.
- Zarrouk, A., Nury, T., Dauphin, A., Frère, P., Riedinger, J.-M., Bachelet, C.-M., Frouin, F., Moreau, T., Hammami, M., Kahn, E., et al. (2015). Impact of C24:0 on actin-microtubule interaction in human neuronal SK-N-BE cells: evaluation by FRET confocal spectral imaging microscopy after dual staining with rhodamine-phalloidin and tubulin tracker green. *Funct. Neurol.* 30, 33–46.
- Zarrouk, A., Riedinger, J.-M., Ahmed, S.H., Hammami, S., Chaabane, W., Debbabi, M., Ben Ammou, S., Rouaud, O., Frih, M., Lizard, G., et al. (2015). Fatty acid profiles in

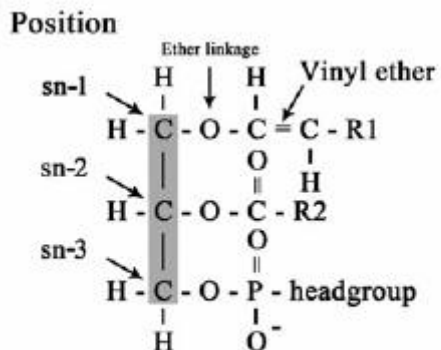
- demented patients: identification of hexacosanoic acid (C26:0) as a blood lipid biomarker of dementia. *J. Alzheimers Dis.* *44*, 1349–1359.
- Zarrouk, A., Vejux, A., Nury, T., El Hajj, H.I., Haddad, M., Cherkaoui-Malki, M., Riedinger, J.-M., Hammami, M., and Lizard, G. (2012). Induction of mitochondrial changes associated with oxidative stress on very long chain fatty acids (C22:0, C24:0, or C26:0)-treated human neuronal cells (SK-NB-E). *Oxid Med Cell Longev* *2012*, 623257.
- Zeidner, G., Sadjia, R., and Reuveny, E. (2001). Redox-dependent gating of G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* *276*, 35564–35570.
- Zemski Berry, K.A., and Murphy, R.C. (2004). Electrospray ionization tandem mass spectrometry of glycerophosphoethanolamine plasmalogen phospholipids. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* *15*, 1499–1508.
- Zhan, Y., Paolicelli, R.C., Sforazzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A.L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., et al. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat. Neurosci.* *17*, 400–406.
- Zhang, Z., Li, D., Blanchard, D.E., Lear, S.R., Erickson, S.K., and Spencer, T.A. (2001). Key regulatory oxysterols in liver: analysis as delta4-3-ketone derivatives by HPLC and response to physiological perturbations. *J. Lipid Res.* *42*, 649–658.
- Zhao, C., and Dahlman-Wright, K. (2010). Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J. Endocrinol.* *204*, 233–240.
- Zhou, F., Yao, H.-H., Wu, J.-Y., Ding, J.-H., Sun, T., and Hu, G. (2008). Opening of microglial K(ATP) channels inhibits rotenone-induced neuroinflammation. *J. Cell. Mol. Med.* *12*, 1559–1570.
- Zhou, J., Yang, C.-X., Zhong, J.-Y., and Wang, H.-B. (2013). Intrathecal TRESK gene recombinant adenovirus attenuates spared nerve injury-induced neuropathic pain in rats. *Neuroreport* *24*, 131–136.
- Zhu, F., Qian, J., and Pan, G. (1999). [Application of IL-1 beta and 8 mRNA and some other indices in monitoring the activity of ulcerative colitis]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* *21*, 384–389.
- Zoeller, R.A., Lake, A.C., Nagan, N., Gaposchkin, D.P., Legner, M.A., and Lieberthal, W. (1999). Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem. J.* *338* (Pt 3), 769–776.
- Zoeller, R.A., Morand, O.H., and Raetz, C.R. (1988). A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J. Biol. Chem.* *263*, 11590–11596.
- Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.-A., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* *6*, 43–50.

- Zorumski, C.F., and Izumi, Y. (2012). NMDA receptors and metaplasticity: mechanisms and possible roles in neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 36, 989–1000.
- Zou, J.Y., and Crews, F.T. (2005). TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. *Brain Res.* 1034, 11–24.
- Zuliani, G., Donnorso, M.P., Bosi, C., Passaro, A., Dalla Nora, E., Zurlo, A., Bonetti, F., Mozzi, A.F., and Cortese, C. (2011). Plasma 24S-hydroxycholesterol levels in elderly subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia: a case-control study. *BMC Neurol* 11, 121.

ANNEXES

STRUCTURES EPA, DHA ET PLASMALOGENES

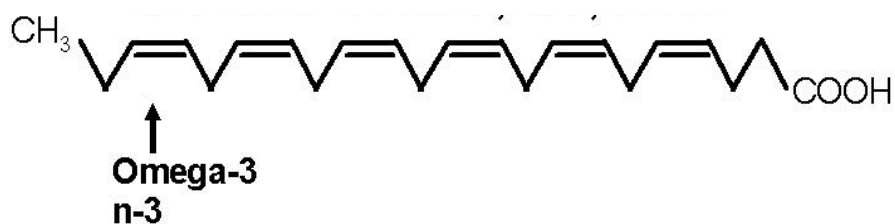
STRUCTURES DU PLASMALOGENES



STRUCTURES DU EPA (Acide Eicosapentanoïque, C20 :5 n-3)



STRUCTURES DU DHA (Acide Docosahexaénoïque, C22 :6 n-3)



PUBLICATION ACCEPTEE ET EN REVISION

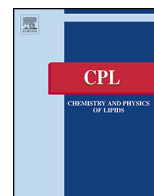


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Chemistry and Physics of Lipids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemphyslip



Evidence of K⁺ homeostasis disruption in cellular dysfunction triggered by 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol, and tetracosanoic acid (C24:0) in 158N murine oligodendrocytes

Maryem Bezine^{a,b}, Meryam Debbabi^{a,c}, Thomas Nury^a, Rym Ben-Khalifa^b,
Mohammad Samadi^d, Mustapha Cherkaoui-Malki^a, Anne Vejux^a, Quentin Raas^a,
Jérôme de Sèze^e, Thibault Moreau^f, Mohamed El-Ayeb^b, Gérard Lizard^{a,*}

^a Univ Bourgogne Franche-Comté, Team 'Biochemistry of the Peroxisome, Inflammation and Lipid Metabolism' EA 7270/INSERM, Dijon, France

^b Univ. Tunis El Manar—Pasteur Institut, Lab. 'Venoms & Therapeutic Biomolecules', Tunis, Tunisia

^c Univ Monastir, LR12ES05, Lab-NAFS 'Nutrition—Functional Food & Vascular Health', Monastir, Tunisia

^d Univ Lorraine, LCPMC-A2, ICPM, Dept of Chemistry, Metz, France

^e Dept Neurology, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France

^f Dept Neurology, Univ. Hospital of Dijon, Univ. Bourgogne Franche-Comté/EA7270, Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 January 2017

Received in revised form 6 March 2017

Accepted 7 March 2017

Available online xxx

Keywords:

Potassium kv channels

4-Aminopyridine

7-Ketocholesterol

24S-Hydroxycholesterol

Tetracosanoic acid (C24:0)

158N murine oligodendrocytes

ABSTRACT

Imbalance in the homeostasis of K⁺ ions has been reported to contribute to the pathogenesis of neurodegenerative diseases. 7-ketocholesterol (7KC), 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC), and tetracosanoic acid (C24:0), often found at increased levels in patients with Alzheimer's disease, Multiple Sclerosis and X-ALD, are able to trigger numerous nerve cell dysfunctions. We therefore studied the impact of 7KC, 24S-OHC, and C24:0 on 158N murine oligodendrocytes, and determined their impact on K⁺ homeostasis. The effects of 7KC, 24S-OHC and C24:0 on lipid membrane organization and membrane potential were examined with merocyanine 540 (MC540) and bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid) trimethine oxonol (DiSBAC2(3)), respectively. The intracellular concentration of K⁺ ([K⁺]_i) was measured by flame photometry and the ratiometric approach using the PBFI-AM fluorescence indicator. To determine the relationships between [K⁺]_i and lipotoxicity, 158N cells were pre-treated with a universal Kv channels blocker, 4-aminopyridine (4-AP), without or with 7KC, 24S-OHC or C24:0. Cell adhesion, cell growth, mitochondrial depolarization, cytoplasmic membrane integrity, the presence of SubG1 and the morphological aspect of the nuclei were determined with various microscopy, flow cytometry and biochemistry methods. 7KC, 24S-OHC and C24:0 induced changes in lipid content and polarization of the cytoplasmic membrane. These events were associated with increased [K⁺]_i. Blocking Kv channels with 4-AP exacerbated 7KC-, 24S-OHC- and C24:0-induced cell dysfunction. 4-AP exacerbated loss of cell adhesion and cell growth inhibition, amplified mitochondrial depolarization and cytoplasmic membrane damage, and increased the percentage of SubG1 cells. The positive correlation between [K⁺]_i and cell death supports the potential involvement of K⁺ in 7KC-, 24S-OHC-, and C24:0-induced cytotoxicity.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sterols and fatty acids are thought to participate in ageing processes (Wood et al., 2014; Zarrouk et al., 2014; El-Sayyad, 2015; Giudetti et al., 2016) and in the pathophysiology of major

neurodegenerative diseases (Heverin et al., 2004; Morley and Banks, 2010; Kreilaus et al., 2016). Cholesterol oxide derivatives, also named oxysterols, which are formed by cholesterol auto-oxidation or enzymatically or by both mechanisms (Zarrouk et al., 2014; Lizard, 2016; Weber et al., 2016; Barriuso et al., 2016; Mutemberezi et al., 2016), have been identified at increased levels in the body fluids (plasma, cerebrospinal fluid (CSF)) and in the brain of patients with Alzheimer's disease (AD) (Björkhem, 2006; Hascalovici et al., 2009; Zarrouk et al., 2014; Testa et al., 2016), multiple sclerosis (MS) (Leoni et al., 2002; van de Kraats et al., 2014; Novakova et al., 2015; Mukhopadhyay et al., 2016; Crick et al.,

* Corresponding author at: Univ. Bourgogne Franche-Comté, Faculté des Sciences Gabriel EA7270/Bio-PeroxiL (Biochemistry of the Peroxisome, Inflammation and Lipid Metabolism) 6, Bd Gabriel, 21 000 Dijon, France.

E-mail address: gerard.lizard@u-bourgogne.fr (G. Lizard).

2016; Zhornitsky et al., 2016), Parkinson's disease (Doria et al., 2016), X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) (Nury et al., 2016), Huntington's disease (Kreilaus et al., 2016; Petrov et al., 2016), amyotrophic lateral sclerosis (Kim et al., 2017) and Niemann-Pick disease (Porter et al., 2010; Klinke et al., 2015; Boenzi et al., 2016; Romanello et al., 2016; Kannenberg et al., 2016). In addition, several fatty acids are thought to promote neurodegeneration. Increased levels of very long chain fatty acids (VLCFA, $C \geq 22$) (Savary et al., 2012), mainly C24:0 and C26:0, have been detected in the plasma and tissues of patients with peroxisomal leukodystrophies, including X-ALD (Singh et al., 1984), which is the most frequent peroxysomopathy affecting 1/17,000 births (Bezman and Moser, 1998), as well as in patients with MS (Moyano et al., 2013; Senanayake et al., 2015) and AD (Kou et al., 2011; Zarrouk et al., 2015c). Growing evidence also supports the hypothesis that several major neurodegenerative disorders such as AD, Parkinson's disease, Huntington's disease, MS, and amyotrophic lateral sclerosis, exhibit defective ion channels. However, the molecules involved and the associated mechanisms have not yet been fully elucidated and are still poorly understood (Kumar et al., 2016).

At the moment, the cytotoxicity of oxysterols and VLCFA is well established on neurons (Zarrouk et al., 2012; Nury et al., 2015), glial (astrocytes, oligodendrocytes) and microglial cells (Hein et al., 2008; Baarine et al., 2012a,b; Nury et al., 2015, 2016; Leoni et al., 2016). Under treatment with oxysterols (7-ketocholesterol (7KC), 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC), 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC)), the molecular mechanisms leading to cell death (defined as oxiaoptophagy (OXIdation + APOPTosis + autoPHAGY)) are associated with oxidative stress together with autophagic and apoptotic criteria (Monier et al., 2003; Nury et al., 2015; Klionsky et al., 2017). However, the impact of oxysterols and VLCFA on ionic homeostasis and ion channel expression and activity (especially those involved in neurotransmission (Na^+ and K^+)) is still unclear even though some oxysterols and VLCFA have been shown to act as modulatory molecules especially on Ca^{2+} channels, which can be involved in cell death activation (Kondratskiy et al., 2015). The modulation of cytoplasmic Ca^{2+} concentration is one of the earliest cellular responses to treatment with oxysterols and VLCFA (Vejux and Lizard, 2009; Mackrill, 2011; Kruska et al., 2015). In many cases, the rise in Ca^{2+} induced by VLCFA and cytotoxic oxysterols is a key event that regulates several cellular processes (Ramasamy et al., 1992; Mackrill, 2011; Hammoud et al., 2013; Zarrouk et al., 2015b). It has been reported that fatty acid-induced intracellular Ca^{2+} mobilization diminished when fatty acid species contained more than 20 carbon atoms, but increased again as the carbon chain length approached 30. In mitochondria of wild-type and *Abcd1*^{-/-} mice, it was described that VLCFA diminished the mitochondrial Ca^{2+} retention capacity (Kruska et al., 2015). VLCFA have also been shown to increase intracellular Ca^{2+} levels in glial cells and neurons from rat hippocampus culture (Hein et al., 2008). These different effects suggest that VLCFA-induced cytotoxicity could be due to the dramatic effects of mitochondrial dysfunction and Ca^{2+} deregulation. As previously described in cells treated with various oxysterols, apoptosis triggered by cytosolic Ca^{2+} can be observed in several cell types: human neuronal cells (SK-N-BE) (Zarrouk et al., 2015b), rat PC12 cells (Lee et al., 2007), human retinal pigment epithelial cells (ARPE19) (Huang et al., 2014), human keratinocytes (HaCaT) (Olivier et al., 2016a), human monocytic cells (U937, THP-1) (Ryan et al., 2006; Lemaire-Ewing et al., 2009; Lordan et al., 2009), human and rat aortic smooth muscle cells (Ares et al., 2000) and human vascular cells (endothelial cells, smooth muscle cells) (Panini and Sinensky, 2001; Millanvoye-Van Brussel et al., 2004). Furthermore, in the human monocytic cell line, THP-1, the involvement of several pro-apoptotic but also anti-apoptotic Ca^{2+} -dependent transduction pathways have been observed under treatment with 7-KC

(Berthier et al., 2005). The most direct mechanism by which oxysterols could promote Ca^{2+} influxes across cellular membranes is via direct biophysical perturbation of the lipid bilayer (Beattie et al., 2005; Olkkonen and Hynynen, 2009). A second way is by binding directly to the two classes of channel located in the plasma membrane (Voltage-Gated Calcium Channels, Transient Receptor Potential-Canonical) forming subunits of calcium channels (Ryan et al., 2006; Jarvis and Zamponi, 2007). Oxysterols could disturb Ca^{2+} homeostasis via transient receptor potential (TRPs) (Kumar et al., 2015), ryanodine receptors (RyRs) and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP₃Rs), which are a family of tetrameric intracellular Ca^{2+} release channels located on the endoplasmic reticulum membrane of mammalian cells (Bootman et al., 2001; Jarvis and Zamponi, 2007).

In addition to Ca^{2+} and Ca^{2+} channels, other ions and ion channels can be affected by oxysterols. However, little is known about the impact of oxysterols on the homeostasis of these other ions (such as chloride (Cl^-), Na^+ and K^+), and on the associated channels. For example, Na^+ and K^+ transport can be disrupted by Na, K-ATPase in the presence of 7KC; in human endothelial cells, 7KC used at non-toxic doses inhibits Na, K-ATPase activity by decreasing expression of its $\alpha 1$ -subunit (Duran et al., 2010). Numerous works have shown the involvement of Na, K-ATPase in signaling pathways and enzyme changes during aging and in diverse neurological diseases: depression and mood disorders, mania, stress, AD, learning and memory disorders, neuronal hyperexcitability and epilepsy (de Lores Arnaiz and Ordieres, 2014). Additionally, cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol, previously described as a neuroprotectant against ischemia-induced neuronal injury (Hu et al., 2014), has been shown to suppress epileptic seizures by negative modulation of voltage-gated Na^+ channels in hippocampal pyramidal neurons from 5 to 14-day-old rat pups, (Tang et al., 2015).

In retinal cells, it has also been shown that 7KC and 25-hydroxycholesterol (25-OHC)-induced toxicity involves P2X7 receptor P2X7R activation (Olivier et al., 2016b). However, these two oxysterols trigger P2X7R activation by two distinct pathways: the P2X7 receptor signaling pathway was pannexin-1-independent with 7KC, whereas it depended on pannexin-1 with 25-OHC (Olivier et al., 2016b). In addition, it has been established that brief stimulation of the non-selective P2X7 purinoreceptor leads to Na^+ and Ca^{2+} influx, as well as K^+ efflux whereas repeated or prolonged stimulation of P2X7R induces the formation of a non-selective pore allowing the entry of solutes up to 900 Da in size (Verhoef et al., 2003; Roger et al., 2008). P2X7R activation has been observed in AD (Sanz et al., 2009), Huntington's disease (Díaz-Hernández et al., 2009), MS, neuropathic pain (Broom et al., 2008), and spinal cord injury (Cotrina and Nedergaard, 2009). Consequently, the involvement of P2X7R in neurodegenerative diseases has stimulated interest in the ions transported by this purinoreceptor and in particular K^+ (Tewari and Seth, 2015).

Moreover, the major brain cholesterol metabolite, 24S-OHC, which is only produced by neurons in the central nervous system (CNS), has also been shown to be a highly selective and a potent positive allosteric modulator of N-Methyl-D-Aspartate Receptors (NMDARs) (Paul et al., 2013). 24S-OHC has been reported to modulate NMDAR-mediated function in hippocampal slices (Sun et al., 2016). NMDARs are glutamate-gated ion channels which regulate the influx of Na^+ and Ca^{2+} with the efflux of K^+ from the cells, and which play critical roles in governing brain function and cognition. Alteration of this activity has been implicated in the pathophysiology of several neuropsychiatric disorders associated with deficits in cognitive functions, including schizophrenia, depression, AD, and epilepsy (Li and Tsien, 2009; Zorumski and Izumi, 2012). Interestingly, ATP-sensitive potassium (KATP) channels localized in the plasma membrane and in the inner

mitochondrial membrane have been shown to play important roles in modulating neuronal excitability, cell survival, and cerebral vascular tone; diazoxide, which is a KATP activator, can ameliorate molecular, cytopathological, and behavioral alterations in 3xTg mice, which constitute a mouse model of AD (Liu et al., 2010).

For instance, altered levels of K^+ have been reported in the blood and brain of patients with AD (Roberts et al., 2016). In post mortem brain samples, significantly higher levels of $[Na^+]$ in the frontal and parietal cortex and of $[K^+]$ in the cerebellum were observed in AD samples than in controls (Vitvitsky et al., 2012). It is noteworthy that in AD, $[Na^+]$ correlated positively with Braak stage, thus indicating an association with disease severity (Graham et al., 2015). In addition, a significant positive correlation between $[K^+]$ and A β plaque load and frontal tissue pH was observed (Graham et al., 2015).

Altogether, these data support the hypothesis that some oxysterols affect ion homeostasis, which is involved in several brain functions and in the conduction of nerve impulses. However, at the moment, few data are available on the impact of major oxysterols (7KC, 24S-OHC) and fatty acids (C24:0) i) on K^+ homeostasis, ii) on K^+ channels (which, like other ion channels, could be oxidized and functionally modified via the oxidative stress triggered by oxysterols and VLCFA) (Kiseliov and Muallem, 2016; Sesti, 2016), and iii) on the roles of K^+ in lipotoxicity. It was therefore of interest to determine the impact of 7KC, 24S-OHC and C24:0 on K^+ homeostasis as well as the contribution of Kv channels on oligodendrocytes, which are myelin synthesizing cells in the CNS (Baumann and Pham-Dinh, 2001), and which can be affected both in demyelinating and non-demyelinating diseases like schizophrenia, MS and AD (Barateiro et al., 2016). To this end, 158N murine oligodendrocytes were cultured without or with 7KC, 24S-OHC and C24:0 associated or not with 4-aminopyridine (4-AP), a universal Kv channels blocker (Grissmer et al., 1994). The effects on the plasma membrane, mitochondrial activity and cell death induction, as well as intracellular K^+ levels were determined.

2. Materials and methods

2.1. Cells, cell cultures and treatments

Murine oligodendrocytes (158N) were immortalized with the SV40 large T-antigen derived from Tabby male (Ta/Y) control mice (Feutz et al., 2001); they show several characteristic of differentiated oligodendrocytes (Baarine et al., 2009). 158N cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium with L-glutamine (Lonza, Levallois, France) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) and 1% antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin) (Pan Biotech) at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Cells were passaged twice a week. Adherent cells were harvested by trypsinization (0.05% trypsin – 0.02% EDTA solution). For the experiments, cells were plated at a density of 34×10^3 cells/cm².

After 24 h of culture, in order to reach 70% confluency, 158N cells were treated for 1 to 24 h with either oxysterols (7KC or 24S-OHC), or C24:0 used in a range of concentrations from 2.5 to 25 μ M, and from 1 to 20 μ M, respectively. Initial solutions of 7KC (Ref: C2394, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and 24S-OHC (provided by Prof. M. Samadi, Univ. Lorraine, Metz, France) were prepared as previously described to obtain a final concentration of 2 mM (Ragot et al., 2013). Briefly, to prepare the initial solution, 800 μ g of oxysterols (7KC or 24S-OHC) were dissolved in 50 μ L of absolute ethanol (EtOH), used as vehicle, and 950 μ L of culture medium was added. C24:0 (Sigma-Aldrich) was prepared at 400 μ M in α -cyclodextrin (vehicle) (Sigma-Aldrich). The maximal final concentration of absolute ethanol or α -cyclodextrin in the

culture medium was 0.05% and 1 μ M, respectively (Baarine et al., 2012a; Nury et al., 2015; Zarrouk et al., 2015a). The concentrations of oxysterols (7-ketocholesterol (7KC), 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC)) and tetracosanoic acid (C24:0) present in heat inactivated FBS and in the culture medium used (DMEM 5% heat-inactivated FBS) were determined as previously described (Arnauld et al., 2009; Yoshida et al., 2008). The concentration of C24:0 was very low: heat-inactivated FBS: 682.20 nmol/L; DMEM 5% heat-inactivated FBS: 28.86 nmol/L. Whereas cholesterol was present in heat-inactivated FBS (0.1740 mmol/L) and in DMEM 5% heat-inactivated FBS (0.0086 mmol/L), no oxysterols resulting from oxidation of the cholesterol on the steroid nucleus or on the lateral chain were identified by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) used in the scan mode. The concentrations of 7KC, 24S-OHC and C24:0, and the treatment times were based on data obtained in 158N cells treated with 7KC and 24S-OHC, and 158N, C6 and SK-N-BE cells treated with C24:0 (Baarine et al., 2012a,b; Nury et al., 2015; Zarrouk et al., 2015a).

To investigate the impact of voltage-gated potassium channels (Kv channels) on the cytotoxicity of oxysterols (7KC, 24S-OHC) and tetracosanoic acid (C24:0), 158N cells were pre-treated for 1 h at 37 °C with 4-aminopyridine (4-AP: 2 mM) (Sigma-Aldrich) prior to the addition of 7KC (2.5–25 μ M), 24S-OHC (2.5–25 μ M) or C24:0 (1–20 μ M). 4-AP is a universal Kv channels blocker (Grissmer et al., 1994). 4-AP was prepared as a stock solution at 800 mM in culture medium.

2.2. Evaluation of cell morphology and cell growth by phase contrast microscopy

Cell morphology and cell growth were evaluated by phase contrast microscopy under an inverted-phase contrast microscope (Axiovert 40, Jena, Zeiss.). Digitized images were obtained with a video camera (AxioCam, Zeiss). Cells cultured in 12-well plates in the absence or presence of 7KC, 24S-OHC (2.5–25 μ M) or C24:0 (1–20 μ M) associated or not with 4-AP (2 mM) for 24 h were observed at the end of the treatment.

2.3. Evaluation of plasma membrane permeability by staining with propidium iodide

After 24 h of incubation without or with 7KC, 24S-OHC (2.5–25 μ M) or C24:0 (1–20 μ M) associated or not with 4-AP (2 mM), adherent and non-adherent cells were pooled. 158N cells were stained for 10 min with propidium iodide (PI: 1 μ g/mL) (Lizard et al., 1995). Membrane permeability was analyzed with a Galaxy flow cytometer (Partec, Münster, Germany). Red fluorescence of PI was collected on a logarithmic scale of fluorescence using a 590 \pm 10 nm bandpass filter and analyzed with Flomax (Partec) and FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) software.

2.4. Measurement of transmembrane mitochondrial potential with DiOC₆(3)

Adherent 158N cells treated or not with 7KC, 24S-OHC (2.5–25 μ M) or C24:0 (1–20 μ M) with or without 4-AP (2 mM) for 24 h were collected by trypsinization, pooled with non-adherent cells, and stained for 10 min at 37 °C with the cationic lipophilic dye 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide DiOC₆(3) (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) used at 40 nM in order to measure mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$); loss of $\Delta\Psi_m$ is indicated by a decrease in green fluorescence measured by flow cytometry. Green fluorescence was collected through a 520 \pm 10-nm band pass filter on a Galaxy flow cytometer (Partec). A total of 10,000 cells were analyzed for each sample, and the fluorescent signals were measured on a

logarithmic scale. Data were analyzed with Flomax (Partec) and FlowJo (Tree Star Inc.) software.

2.5. Characterization of nuclear morphology by staining with Hoechst 33342

The nuclear morphology of control (untreated cells), vehicle-treated cells (EtOH, α -cyclodextrin), 7KC-, 24S-OHC-, and C24:0-treated cells cultured without or with 4-AP was characterized by fluorescence microscopy after staining with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) used at 2 μ g/mL (Lizard et al., 1995). Cell deposits of about 40,000 cells were applied to glass slides by cytocentrifugation (5 min, 1200 rpm) with a cytospin 2 (Shandon, Cheshire, UK), mounted in Dako fluorescent mounting medium (Dako, Copenhagen, Denmark) and stored in the dark at 4 °C until observation. The morphological aspect of the cell nuclei was determined with an Axioskop fluorescent microscope (Zeiss). For each sample, 300 cells were examined.

2.6. Flow cytometric quantification of Sub-G1 cells after staining with propidium iodide

To evaluate cellular DNA content, adherent and non-adherent cells were collected by trypsinization and fixed in 80% (v/v) cold ethanol (overnight, –20 °C), washed in PBS, and stained with the following solution: 100 μ g/mL RNase A (Sigma-Aldrich) and 50 μ g/mL PI. After 1 h of incubation at 37 °C in the dark, 1–2 mL of PBS were added, and flow cytometric analyses were performed on a Galaxy flow cytometer (Partec). Red fluorescence of PI was detected through a 590 \pm 10 nm band pass filter, and measured on a linear scale. For each sample, 10,000 cells were acquired and data were analyzed with Flomax (Partec) software.

2.7. Flow cytometric analysis of plasma membrane lipid packing with merocyanine 540

Merocyanine 540 (MC540) is a negatively charged chromophore which binds to the outer membrane of cells (Schlegel et al., 1993). The loss of asymmetry and altered packing of the plasma membrane enhance MC540 fluorescence (Schlegel et al., 1993). To evaluate the impact of 7KC, 24S-OHC and C24:0 on plasma membrane lipid packing, adherent and non-adherent 158N cells were pooled and stained with MC 540 (2.5 μ g/mL) (Sigma-Aldrich) (Langner and Hui, 1993). After 10 min at 37 °C, cells were analyzed by flow cytometry on a Galaxy flow cytometer (Partec). For each sample, 10,000 cells were acquired. The fluorescence of MC540 was collected through a 590 \pm 10 nm band pass filter and measured on a logarithmic scale (Veju et al., 2009). Cells with low MC540 binding were designated as MC540 dim or normal cells and cells with high M540 binding were denoted as cells with a destabilized membrane or bright cells (Laakko et al., 2002). Data were expressed by the [MC 540 bright cells]/[MC 540 dim cells] ratio.

2.8. Fluorimetric determination of plasma membrane potential with DiSBAC2 (3)

Changes in plasma membrane potential ($\Delta\Psi_p$) were monitored by measuring the increase in absorbance of Bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid) trimethine oxonol (DiSBAC2(3)). DiSBAC2(3) is a voltage-sensitive dye (Kitayama et al., 1990; Yamaguchi et al., 2005). Hyperpolarization causes extrusion of the dye and decreased fluorescence, whereas depolarization causes intracellular accumulation of the dye and enhances fluorescence. 158N cells were plated in black polystyrene 96-well microplates at a density of 10×10^3 cells/well. After 24 h of incubation, the medium was removed and cells were treated for 1–24 h with 7KC (2.5–25 μ M),

24S-OHC (2.5–25 μ M), C24:0 (1–20 μ M). The medium was removed and cells were washed using the assay buffer (HBSS 20 mM HEPES, 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and 5 mM glucose [pH 7.4]) containing 5 μ M DiSBAC₂(3) (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific), and incubated for 30 min at 37 °C with 5 μ M DiSBAC₂(3). Fluorescence intensity was recorded at 580 nm with excitation at 540 nm using a Tecan spectrofluorimeter (Infinite 200 PRO, Lyon, France) (Kim et al., 2013).

2.9. Microplate fluorimetric assay for the measurement of intracellular potassium

With this technique, non adherent cells are not taken in consideration; the measurement of $[K^+]_i$ is only realized on adherent cells (living cells). To assess the modification of $[K^+]_i$ during cell death processes induced by treatment with 7KC, 24S-OHC and C24:0, potassium-binding benzofuran isophthalate-acetoxymethyl ester (PBFI-AM) (Sigma-Aldrich) (Kasner and Gane, 1992) was used on adherent cells in black polystyrene 96-well microplates for the fluorometric determination of $[K^+]_i$, as described previously (Andersson et al., 2006; Wald et al., 2014). The acetoxymethyl ester group linked to the dye renders the molecule uncharged, and thereby able to permeate living cell membranes. Once inside the cell, the lipophilic blocking groups are cleaved by endogenous cellular esterases, resulting in a charge-free acid that is unable to pass through the cell membrane. Upon binding by K^+ , the excitation of PBFI shifts to shorter wavelengths (340 nm instead of 380 nm). 158N cells were plated in black polystyrene 96-well microplates at a density of 10×10^3 cells/well. After 24 h of incubation, the medium was removed and cells were treated for 24 h with 7KC (2.5–25 μ M), 24S-OHC (2.5 to 25 μ M), C24:0 (1–20 μ M) or with 4-AP (4 mM) used as positive control. Cells were washed with HBSS and equilibrated with 50 μ L of 10 μ M of PBFI-AM in the presence of 0.04% Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich). Cells were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere in the dark to allow for complete conversion of the AM dyes to their membrane impermeant forms of PBFI. After 2 h, excess PBFI-AM was removed by washing twice with HBSS. Ratiometric measurements were performed using a Tecan spectrofluorimeter (Infinite 200 PRO). The fluorescence intensity of PBFI (excitation wavelength 340 and 380 nm, emission wavelengths 510 nm) was recorded alternately. The ratio of the fluorescence intensities obtained by exciting PBFI at (340/380 nm) while monitoring emission at 510 nm is used to determine the intracellular K^+ content.

2.10. Measurement of intracellular potassium by flame photometry

With flame photometry, the measurement of $[K^+]_i$ was realized both on non adherent cells (dead cells) and adherent cells (living cells) collected by trypsinization. Intracellular potassium $[K^+]_i$ was measured using a Flame Photometer (Biocode Hycel PHF 108, Biocode Hycel, Liège, Belgium) with a propane flame; lithium was used as an internal standard. After 24 h of culture, 158N cells were treated for 24 h with either oxysterols (7KC or 24S-OHC), or C24:0 used in a range of concentrations from 2.5 to 25 μ M, and from 1 to 20 μ M, respectively. Adherent and non-adherent cells were washed with HBSS, resuspended in 1 mL of deionized water and lysed by repeated cycles of freezing and thawing. They were then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatant was analyzed.

2.11. Polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting

The amount of protein was determined on untreated and 158N treated cells using western blotting as previously described (Ragot

et al., 2013; Nury et al., 2015). Immunopositive bands were visualized by the enhanced chemiluminescence kit (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Fisher Scientific) and Chemidoc XRS⁺ (Santa Cruz Biotechnology). Semi-quantification of luminescence signal intensity was determined by computer-assisted analyses of optical density using Image Lab 4.0.1 software (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France).

2.12. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SD. Statistical analyses were performed by two-way ANOVA (Tukey's multiple comparison test) with GraphPad Prism 6.07 software. *P* values less than or equal to 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effects of 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid (C24:0) on plasma membrane lipid packing evaluated with merocyanine 540 by flow cytometry

The effects of 7KC (2.5, 12.5 and 25 μ M), 24S-OHC (2.5, 12.5 and 25 μ M) and C24:0 (1, 5, 10 and 20 μ M) on the packing of the plasma membrane lipid bilayer was studied in 158N cells after 1, 3, 8, 14 and 24 h of culture by staining with MC540. MC540 stains all cells and becomes brightly fluorescent only in those with disordered membranes (Langner and Hui, 1993). Bright cells (MC540 bright) correspond to cells with altered plasma membrane lipid packing; dim cells correspond to normal cells (MC540 dim) (Vejux et al., 2009). The alteration of plasma membrane lipid packing was determined by the [(MC540 bright)/MC540 dim (MC540 dim)] ratio. Treatment with 7KC, 24S-OHC and C24:0 induced a more or less marked dose- and time-dependent effect on cytoplasmic membrane lipids which depends on the compound considered (Fig. 1). The most important effects were observed with 24S-OHC and 7KC, and the lowest with C24:0. A progressive effect was found with 24S-OHC but not with 7KC. These differences between 24S-OHC and 7KC could be due to their orientation in the plasma membrane (Olkkonen and Hynynen, 2009). Thus, membrane lipid changes were induced by 7KC (25 μ M), 24S-OHC (12.5–25 μ M) and C24:0 (10–20 μ M) after 14 h of incubation and the mean magnitude of depolarization induced by 7KC (25 μ M) and 24S-OHC (2.5–25 μ M) was significantly higher than that induced by C24:0 (10–20 μ M). 24S-OHC (2.5 μ M) induced membrane depolarizations after 24 h of incubation. The presence of vehicle (EtOH 0.005–0.05%) and α -cyclodextrin (0.05–1 mM) had no effect on the MC540 bright/MC540 dim ratio compared with untreated cells.

3.2. Effects of 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid (C24:0) on transmembrane plasma membrane potential ($\Delta\Psi_p$) evaluated with DiSBAC2(3) by fluorimetry

158N cells were exposed to 7KC (2.5, 12.5 and 25 μ M), 24S-OHC (2.5, 12.5 and 25 μ M) or C24:0 (1, 5, 10 and 20 μ M) and $\Delta\Psi_p$ was monitored with DiSBAC2(3) (a negatively charged bisoxonol) after various treatment durations: 1, 3, 8, 14 and 24 h. The increase in fluorescence intensity with DiSBAC2(3) indicates plasma membrane depolarization; it corresponds to an increased intracellular concentration of DiSBAC2(3). For each assay, the fluorescence intensity was measured and normalized to the number of cells. Data shown correspond to [fluorescence in the assay normalized to the corresponding number of cells/fluorescence in untreated cells (control) normalized to the corresponding number of cells]. In agreement with data obtained with MC540 (Fig. 1), treatment with 7KC, 24S-OHC and C24:0 also induce a more or less marked dose- and time-dependent effect on cytoplasmic membrane lipids which

depends on the compound considered (Fig. 2). The most important effects were observed with 24S-OHC and 7KC, and the lowest with C24:0. As shown in (Fig. 2), 7KC and 24S-OHC (25 μ M) increased the fluorescence intensity of DiSBAC2(3) after 3 h, and 7KC (12.5 μ M) after 8 h. No differences were detected in cells exposed to 24S-OHC (2.5 and 12.5 μ M) or to 7KC (2.5 μ M) before 14 h compared to vehicle (EtOH 0.005–0.05%). Dose-related fluorescence intensity increased with longer periods of incubation. Treatments with C24:0 had no significant effects before 24 h of incubation. Noteworthy, the effects observed on $\Delta\Psi_p$ were most often associated with modifications of plasma membrane lipid packing evaluated with MC 540. However, with C24:0, whereas no changes of $\Delta\Psi_p$ were observed at 14 h, an increased ratio [MC 540 bright/MC 540 dim] was found, suggesting that with C24:0 lipid membrane disorganization precedes the loss of $\Delta\Psi_p$, whereas under treatment with 7KC and 24S-OHC these two events can be considered as concomitant. In addition, whatever the vehicle considered, no effects were observed when compared with untreated cells.

3.3. Effects of 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid (C24:0) on the intracellular K⁺ level evaluated in microplates with the PBFI-AM fluorescence indicator

The impact of 7KC (2.5, 12.5 and 25 μ M), 24S-OHC (2.5, 12.5 and 25 μ M) and C24:0 (1, 5, 10 and 20 μ M) on the intracellular level of K⁺ was also determined after 24 h of treatment using the ratiometric approach employing the PBFI-AM fluorescence indicator. For each assay the [340 nm/380 nm] fluorescence ratio was measured. Data shown correspond to [fluorescence ratio in the assay/fluorescence ratio in untreated cells (control)]. As shown in Fig. 3, in adherent cells (corresponding to living cells), significantly higher cytosolic concentrations of K⁺ were found under treatment with 7KC and 24S-OHC compared with vehicle-treated cells (7KC (12.5 μ M): 111.20 \pm 2.72%, 24S-OHC (12.5 μ M): 110.10 \pm 2.70%), corresponding vehicle concentration (EtOH 0.025%): 100.20 \pm 2.47%; 7KC (25 μ M): 121.50 \pm 2.54%, 24S-OHC (25 μ M): 120.40 \pm 2.63%, corresponding vehicle concentration (EtOH 0.05%): 100.20 \pm 2.27%), as well as with C24:0 (C24:0 (20 μ M): 129.50 \pm 4.92%), corresponding vehicle concentration (α -cyclodextrin (1 mM): 107.40 \pm 4.20). Compared with untreated cells (control), no significant increase in intracellular K⁺ was seen with ethanol (EtOH: 0.005–0.05%) or with α -cyclodextrin (α -cyclodextrin: 0.05 to mM). It is noteworthy that treatment with 4-AP (4 mM), a universal Kv channels blocker used as a positive control to favor the intracellular accumulation of K⁺, significantly increased levels of intracellular K⁺ (Fig. 3). These data support that the intracellular K⁺ accumulation detected on adherent cells (considered as living cells) occurs before cell death.

3.4. Effects of 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid (C24:0) on the intracellular K⁺ level evaluated with flame photometry

The flame photometry method, which is commonly used for routine analysis of K⁺, was employed to confirm the increase in cytosolic K⁺ in 158N cells treated for 24 h with either 7KC (2.5, 12.5 and 25 μ M), 24S-OHC (2.5, 12.5 and 25 μ M) or C24:0 (1, 5, 10 and 20 μ M) (Fig. 4). Compared with the fluorescent method with PBFI-AM, flame photometry is known to be more sensitive and able to detect lower intracellular concentrations of K⁺ (Lahet et al., 2007). In addition, flame photometry is realized on cell lysates, and includes all cells (living and damaged/dead cells; i.e., adherent and non-adherent cells, respectively), whereas PBFI-AM only accumulates in cells with active membrane esterases (mainly living cells, which are adherent cells) (Kasner and Ganz, 1992). For each assay,

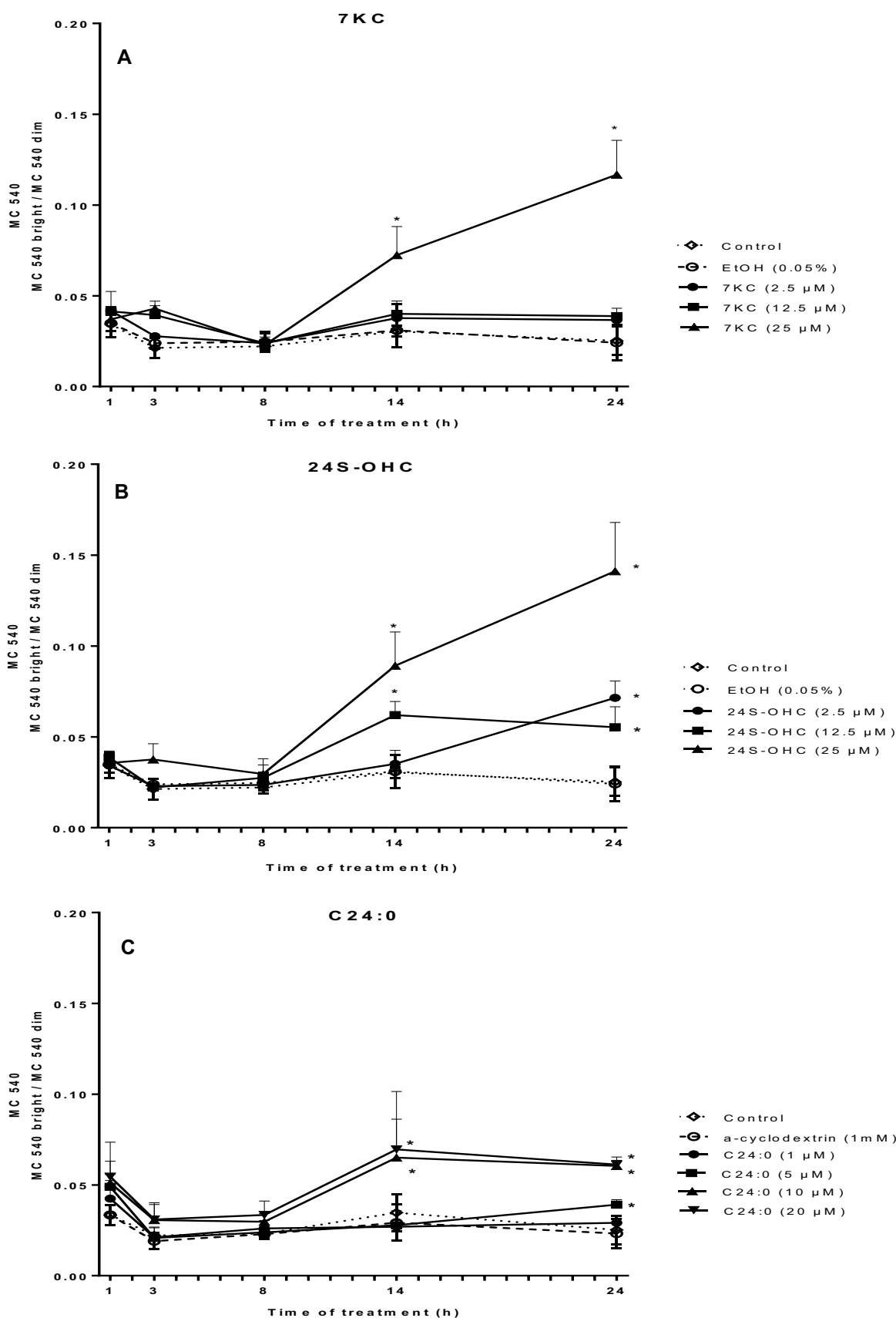


Fig. 1. Impact of 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid on lipid membrane organization of 158N murine oligodendrocytes evaluated with merocyanine 540 (MC 540). Subconfluent 158N cells were exposed to vehicle, 7KC, 24S-OHC or C24:0 for 1–24 h. 7KC and 24S-OHC were diluted in ethanol (0.005–0.05%) and C24:0 in α -cyclodextrin (0.05–1 mM). Values are mean \pm SD of three independent assays realized in triplicate. Statistical analyses were realized with ANOVA (Tukey's multiple comparisons) test. Significant differences are indicated as: # $P \leq 0.05$, vehicle/control; * $P \leq 0.05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0/vehicle.

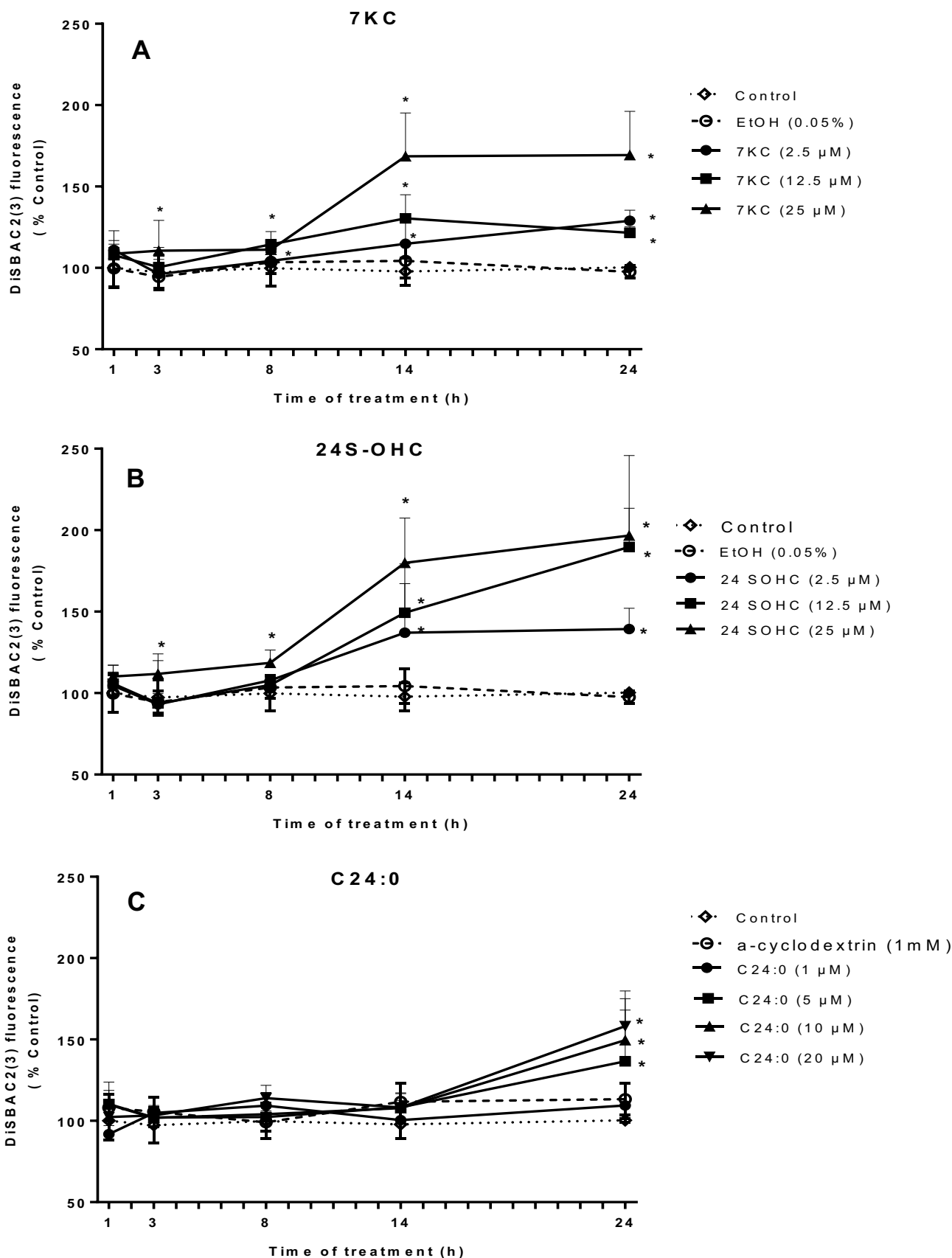


Fig. 2. Measurement of plasma membrane potential with DiSBAC2(3) in 158N murine oligodendrocytes treated with 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid. Subconfluent 158N cells were exposed to vehicle, 7KC, 24S-OHC or C24:0 for 1–24 h. 7KC and 24S-OHC (2.5–25 μ M) were diluted in ethanol (0.005–0.05%) and C24:0 (1–20 μ M) in α -cyclodextrin (0.05–1 mM). Values are mean \pm SD of three independent assays realized in triplicate. Statistical analyses were realized with ANOVA (Tukey's multiple comparisons) test. Significant differences are indicated as: # $P \leq 0.05$, vehicle/control; * $P \leq 0.05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0/vehicle.

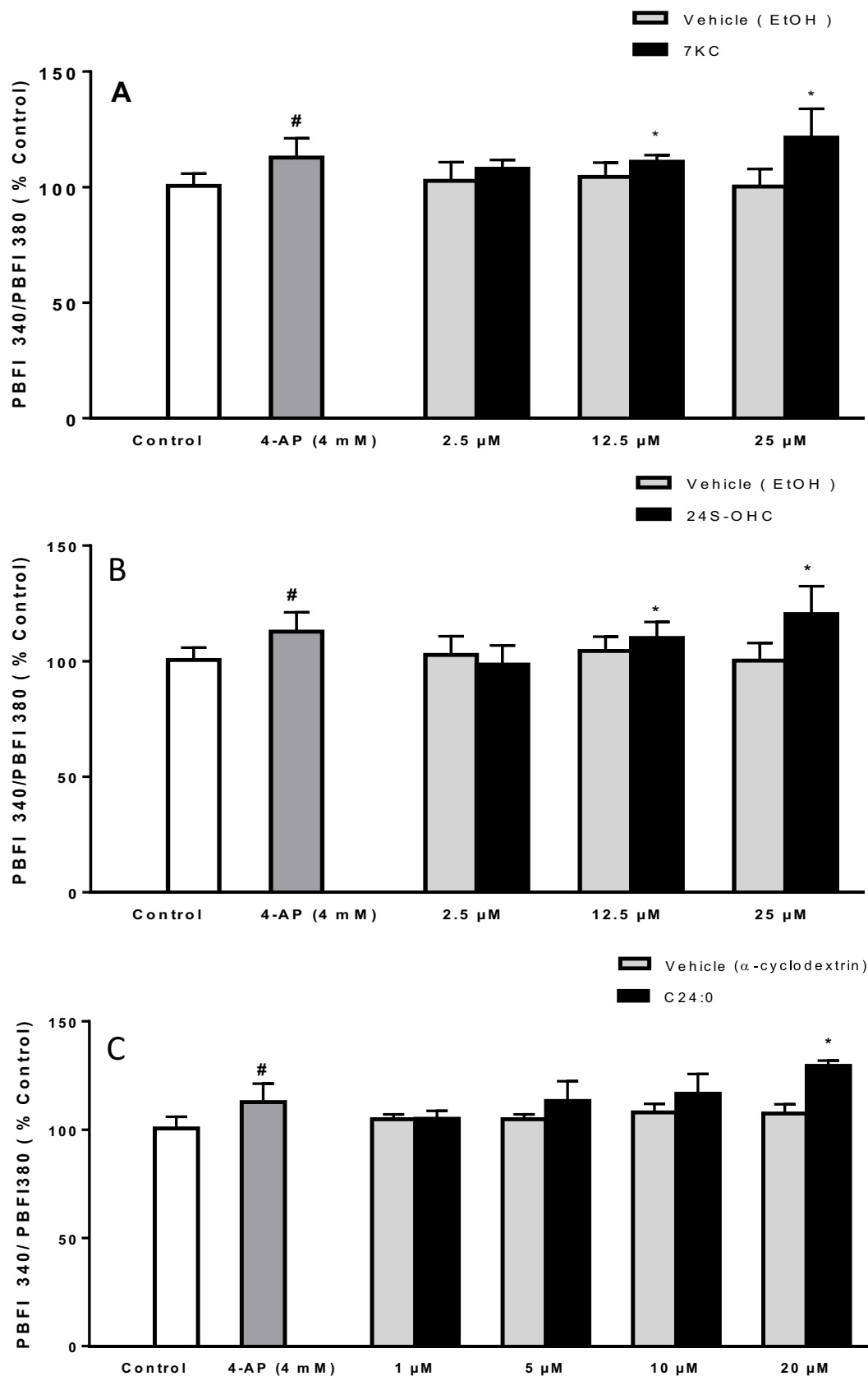


Fig. 3. Effects of 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid on intracellular K^+ concentration ($[K^+]_i$) evaluated with the PBFI-AM fluorescence indicator. Subconfluent 158N cells were exposed to vehicle, 7KC, 24S-OHC or C24:0 for 1–24 h. 7KC and 24S-OHC (2.5–25 μ M) were diluted in ethanol (0.005–0.05%) and C24:0 (1–20 μ M) in α -cyclodextrin (0.05 to 1 mM). Variation in $[K^+]_i$ was estimated by loading cells with the K^+ sensitive fluorescent indicator PBFI-AM. Values are mean \pm SD of three independent assays realized in triplicate. Statistical analyses were realized with ANOVA (Tukey's multiple comparisons) test. Significant differences are indicated as: # $P \leq 0.05$, vehicle/control or 4-AP; * $P \leq 0.05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0/vehicle.

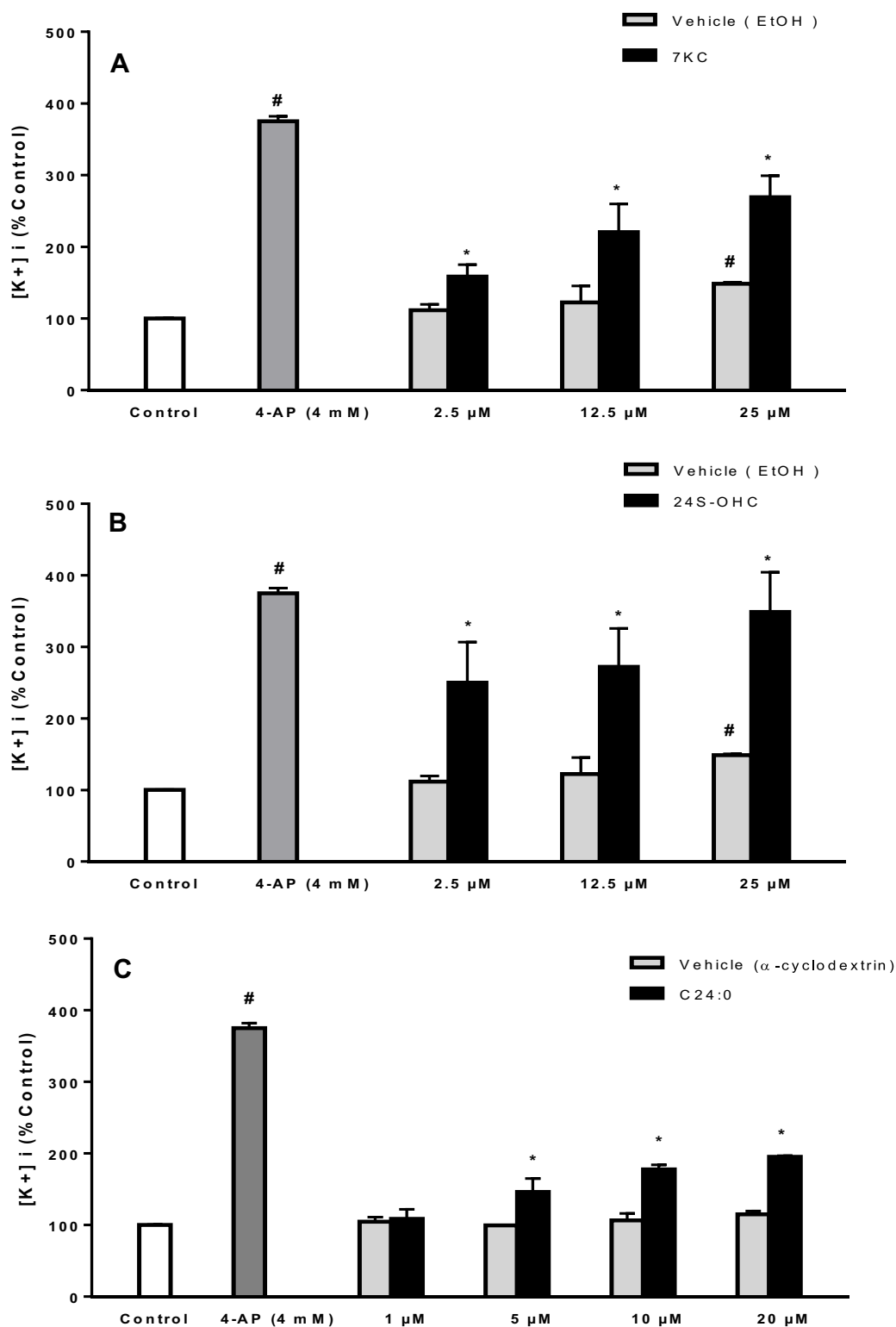


Fig. 4. Effects of 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid on intracellular K^+ concentration ($[K^+]_i$) evaluated with flame photometry. Subconfluent 158N cells were exposed to vehicle, 7KC, 24S-OHC or C24:0 for 1–24 h. 7KC and 24S-OHC (2.5–25 μ M) were diluted in ethanol (0.005–0.05) and C24:0 (1–20 μ M) in α -cyclodextrin (0.05–1 mM). Variation in $[K^+]_i$ was estimated by flame photometry. Values are mean \pm SD of three independent assays realized in triplicate. Statistical analyses were realized with ANOVA (Tukey's multiple comparisons) test. Significant differences are indicated as: # $P \leq 0.05$, vehicle/control or 4-AP; * $P \leq 0.05$, vehicle/7KC, 24S-OHC or C24:0.

the intracellular K^+ value was measured and normalized to the number of cells. Data shown correspond to $[K^+]_i$ value in the assay normalized to the corresponding number of cells/intracellular K^+ value in untreated cells (control) normalized to the

corresponding number of cells]. With flame photometry, significant differences between EtOH, 7KC and 24S-OHC were detected from the concentration of 2.5 μ M (7KC (2.5 μ M): $158.30 \pm 2.28\%$, 24S-OHC (2.5 μ M): $249.90 \pm 4.19\%$ and the corresponding vehicle

concentration (EtOH: 0.005%): $111.60 \pm 0.55\%$). With C24:0, significant increases were detected from the concentration of $5 \mu\text{M}$ (C24:0 ($5 \mu\text{M}$): $146.30 \pm 18.56\%$, corresponding vehicle concentration (α -cyclodextrin: 0.25 mM): $99.66 \pm 0.53\%$). It is noteworthy that treatment with 4-AP (4 mM), used as a positive control, significantly increased levels of intracellular K^+ . Comparatively with the data obtained on microplates, the most important differences observed between control, vehicle-treated cells and 7KC-, 24S-OHC-, and C24:0-treated cells by flame photometry not only support that this technique is more sensitive than the microplate fluorimetric assay, but they also support the hypothesis that the accumulation of K^+ in non adherent cells (including dying and dead cells) is probably higher than in living cells (adherent cells).

3.5. Incidence of Kv channels blockage, induced with 4-AP, on the cytotoxic effects of 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol, and tetracosanoic acid (C24:0): loss of cell adhesion, decrease in cell growth and induction of cell death

To determine whether intracellular K^+ concentration resulting from Kv channels blockage might contribute to increasing the cytotoxic effects of 7KC (2.5 – $25 \mu\text{M}$), 24S-OHC (2.5 – $25 \mu\text{M}$) and C24:0 (1 – $20 \mu\text{M}$), 158N cells were cultured for 24 h without or with 7KC, 24S-OHC and C24:0 associated or not with 4-AP (2 mM). 4-AP was added to the culture medium 1 h before 7KC, 24S-OHC, and C24:0. Under these conditions, the following parameters were measured: cell adhesion, cell growth, transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\Psi\text{m}$), plasma membrane integrity, condensation

and/or fragmentation of the nuclei, internucleosomal DNA fragmentation (evaluated with the SubG1 peak), and activation of caspase-3.

Marked effects on cell adhesion and cell growth were observed by phase contrast microscopy in cells treated with 7KC (12.5 and $25 \mu\text{M}$), 24S-OHC (12.5 and $25 \mu\text{M}$) and C24:0 (10 and $20 \mu\text{M}$) in comparison with untreated and vehicle-treated cells. 4-AP (2 mM) exacerbated the loss of cell adhesion and increased the number of cells floating in the culture medium (Supplementary Fig. 1). However, the quantity of non adherent cells (dying or dead cells) is weakly amplified by 4-AP in the presence of 7KC and 24S-OHC, whereas it is strongly increased with 4-AP in the presence of C24:0 (Supplementary Fig. 1). These data are in agreement with those presented in Fig. 5 which shows significant increases in the percentages of cells with depolarized mitochondria (DiOC₆(3) negative cells) and with damaged cytoplasmic membranes (PI positive cells) under treatment with 7KC, 24S-OHC and C24:0, and a more or less important increase of these percentages in the presence of 4-AP. Indeed, the percentages of DiOC₆(3) negative cells and PI positive cells, considered as dying or dead cells, are weakly increased by 4-AP in the presence of 7KC and 24S-OHC whereas they are strongly increased in the presence of C24:0. Interestingly, a positive correlation was found between intracellular K^+ levels and the percentage of PI-positive cells (Fig. 6).

In addition, in agreement with previous investigations (Nury et al., 2015), treatment with 7KC and 24S-OHC significantly increased the proportion of cells with condensed and/or fragmented nuclei (characteristic of apoptotic cells), and this was associated with an increase in the percentage of cells in SubG1,

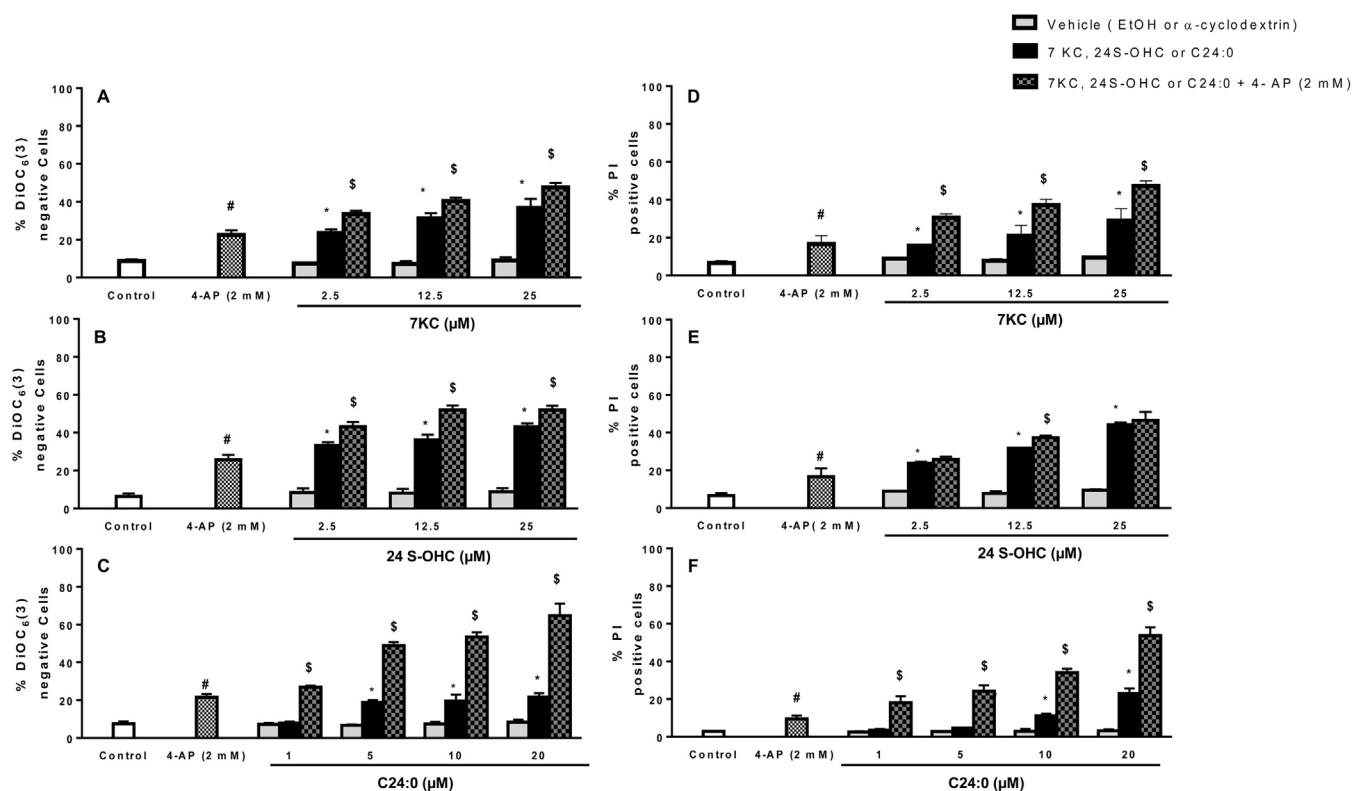


Fig. 5. Effects of 4-AP, a universal Kv channel blocker, on mitochondrial depolarization and plasma membrane permeability triggered by 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid. Subconfluent 158N cells were pretreated for 1 h with 4-AP (2 mM), which favors intracellular K^+ accumulation, and then cultured for 24 h with 7KC, 24S-OHC (2.5 , 12.5 and $25 \mu\text{M}$) or C24:0 (1 , 5 , 10 and $20 \mu\text{M}$). 7KC and 24S-OHC were diluted in ethanol (0.005 – 0.05%) and C24:0 in α -cyclodextrin (0.05 – 1 mM). Transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\Psi\text{m}$) and plasma membrane permeability and/or cell death were quantified by flow cytometry after staining with DiOC₆(3) (A–C) and propidium iodide (PI) (D–F), respectively. The percentage of DiOC₆(3) negative cells (cells with depolarized mitochondria) and of cells with increased plasma membrane permeability to PI (cells with damaged cytoplasmic membrane and/or dead cells) were determined. Data are mean \pm SD from three independent experiments realized in triplicate. Statistical analyses were realized with ANOVA (Tukey's multiple comparisons) test. Significant differences are indicated as: # $P \leq 0.05$, vehicle or 4-AP/control; * $P \leq 0.05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0/vehicle; \$ $P \leq 0.05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0 + 4-AP (2 mM)/7KC, 24S-OHC or C24:0.

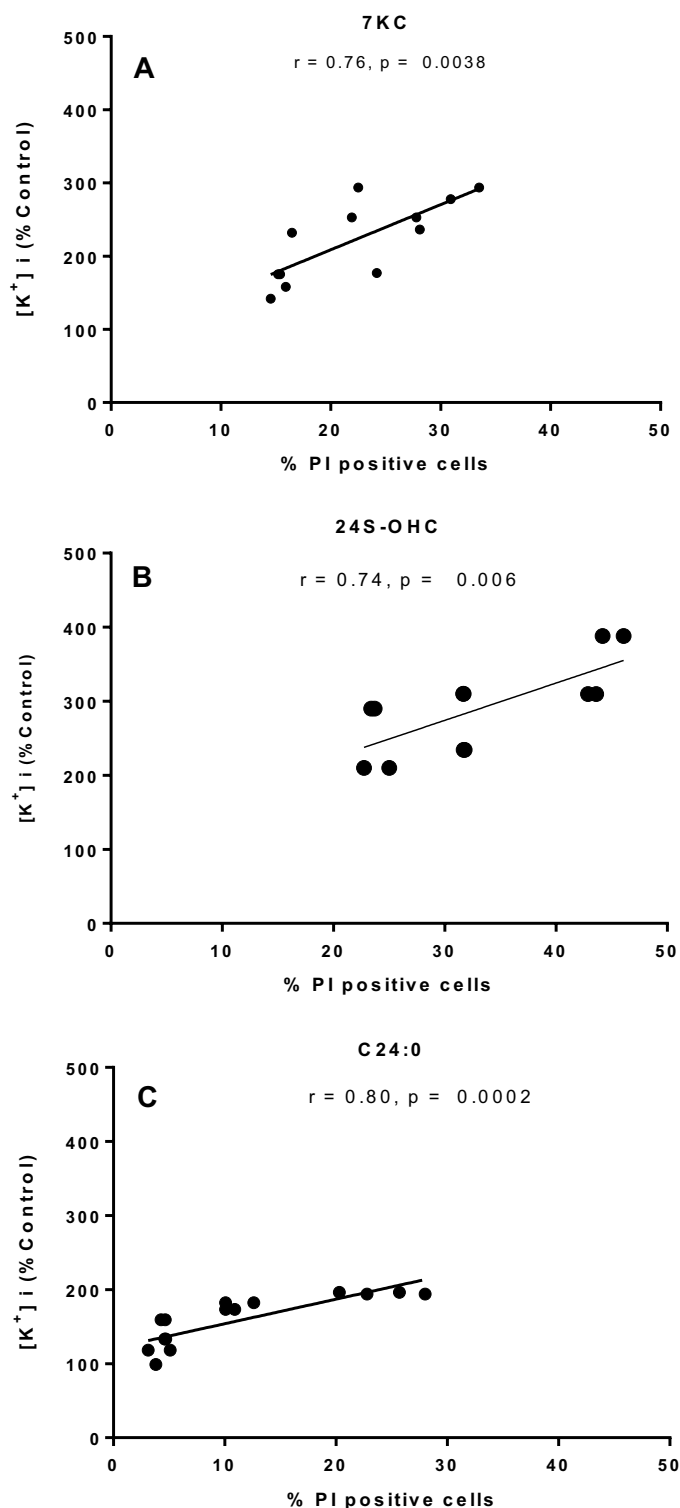


Fig. 6. Correlation between intracellular K^+ concentration ($[K^+]_i$) and cell viability. Subconfluent 158N cells were exposed for 24 h to increasing concentrations of 7KC, 24S-OHC or C24:0. $[K^+]_i$ was estimated by flame photometry and cell viability was determined by flow cytometry after staining with propidium iodide (PI). The correlation was determined with the Spearman correlation test.

thus suggesting internucleosomal DNA fragmentation (Fig. 7). Interestingly, these effects were exacerbated by 4-AP. In agreement with previous data (Kahn et al., 2011), treatment with C24:0 mainly induced a non-apoptotic mode of cell death (Fig. 7). The low percentage of apoptotic cells induced by C24:0 was, however, significantly increased by 4-AP. As levels of 7KC are often increased in numerous diseases (Zarrouk et al., 2014; Testa et al., 2016),

including neurodegenerative diseases, we investigated whether 4-AP was able to exacerbate 7KC-induced caspase-3 activation. It is noteworthy that when 7KC was associated with 4-AP, increased levels of cleaved caspase-3 were found (Supplementary Fig. 2).

Altogether, our data support the hypothesis that inhibition of Kv channels leading to enhanced intracytoplasmic levels of K^+ contributes to increase 7KC-, 24S-OHC- and C24:0-induced cell

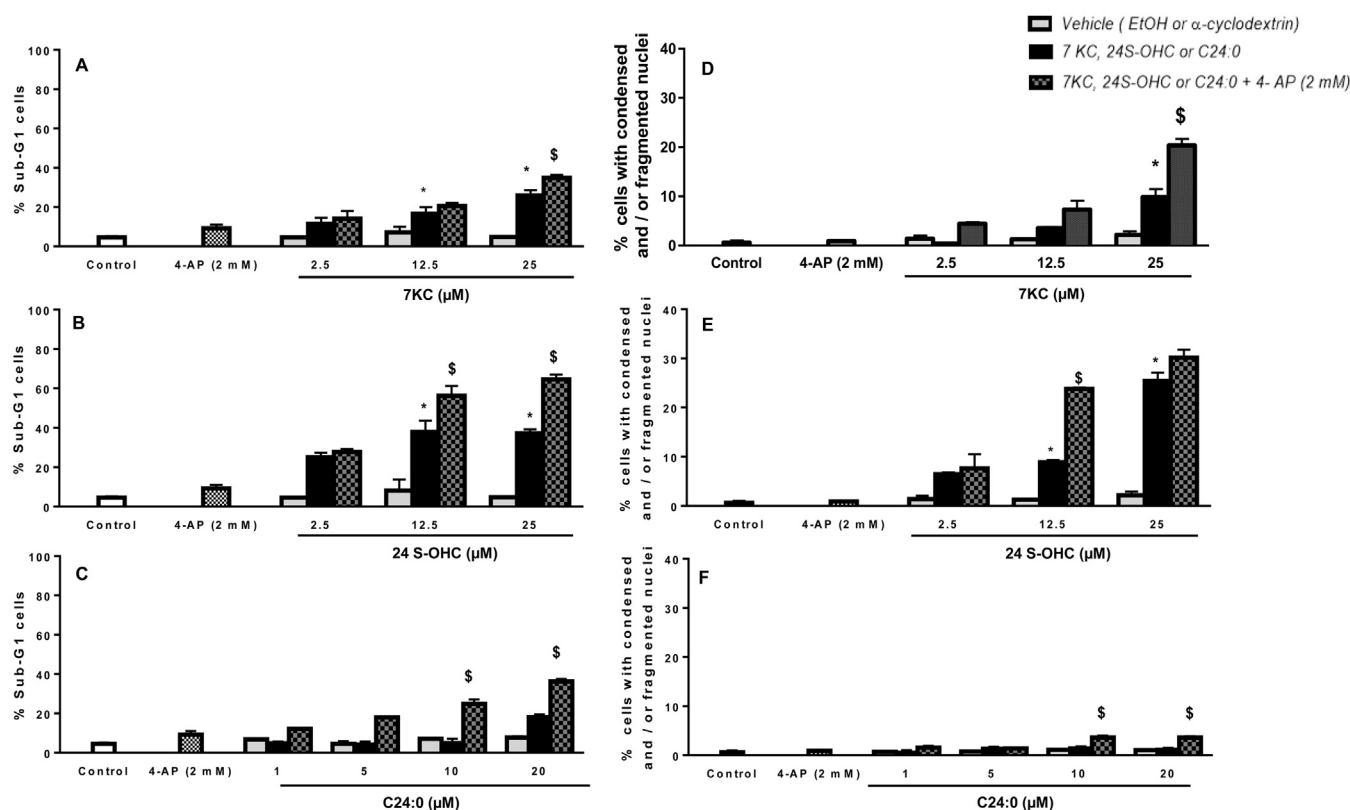


Fig. 7. Effects of high intracellular K^+ concentration on 7-ketocholesterol-, 24S-hydroxycholesterol- and tetracosanoic acid-induced apoptosis. Subconfluent 158N cells were pretreated for 1 h with 4-AP (2 mM) and then cultured for 24 h with 7KC or 24S-OHC (2.5, 12.5 and 25 μ M) or C24:0 (1, 5, 10 and 20 μ M); 7KC and 24S-OHC were diluted in ethanol (0.005–0.05%) and C24:0 in α -cyclodextrin (0.05 to 1 mM). Sub-G1 cells were detected by flow cytometry after staining with PI (A–C). Percentages of cells with condensed and/or fragmented nuclei (characteristic of apoptotic cells) were determined by fluorescence microscopy after staining with Hoechst 33342 (normal cells are characterized by round and regular nuclei and apoptotic cells by condensed and/or fragmented nuclei) (D–F). Data are mean \pm SD from three independent experiments realized in triplicate. Statistical analyses were realized with ANOVA (Tukey's multiple comparisons) test. Significant differences are indicated as: # $P < 0.05$, vehicle or 4-AP (2 mM)/control; * $P < 0.05$, KC, 24S-OHC or C24:0/vehicle; \$ $P \leq 0.05$, 7KC, 24S-OHC or C24:0 + 4-AP (2 mM)/7KC, 24S-OHC or C24:0.

death. Based the most important increase of DiOC₆(3) negative cells and PI positive cells observed in the presence of 4-AP associated with C24:0, than with 4-AP associated with 7KC and 24S-OHC, our data also suggest different involvements of Kv channels in oxysterols (7KC, 24S-OHC)- and C24:0-induced cell death.

4. Discussion

There is considerable evidence that mitochondrial dysfunction, oxidative stress and dysregulated lipid homeostasis within the brain may be key mechanisms leading to neurodegeneration. Indeed, high levels of oxysterols, and in particular 7KC and 24S-OHC, have been found in the plasma, CSF, and/or brain tissue of patients in several neurodegenerative diseases such as AD, MS, and X-ALD (Leoni et al., 2002; Engelen et al., 2012; Mukhopadhyay et al., 2016). Moreover, in AD, MS and peroxysomopathies, increased plasma and tissue levels of very long chain fatty acids (VLCFA: C24:0 and C26:0) were found (Kou et al., 2011; Zarrouk et al., 2014; Senanayake et al., 2015; Nury et al., 2016). At the moment, 7KC, 24S-OHC and VLCFA are known for their ability to trigger cell death associated with mitochondrial and peroxisomal damage and oxidative stress (Debbabi et al., 2016; Nury et al., 2016). Currently, nothing is known about the impact of 7KC, 24S-OHC and C24:0 on the intracellular concentration of K^+ ($[K^+]_i$). Our data show for the first time that 7KC, 24S-OHC and C24:0 used at cytotoxic concentrations increased $[K^+]_i$ and establish a link between lipotoxicity and K^+ homeostasis. Importantly, $[K^+]_i$ correlated positively with cell death. In addition, blocking Kv

channels with 4-AP, a universal Kv channels blocker, more or less exacerbated 7KC-, 24S-OHC- and C24:0-induced cellular dysfunction suggesting different involvements of Kv channels in oxysterols (7KC, 24S-OHC)- and C24:0-induced cell death.

Using MC540, we showed that 7KC and 24S-OHC disorganized the packaging of cytoplasmic membrane lipids in 158N murine oligodendrocytes. These observations are in agreement with those observed in 7KC-treated U937 cells (Vejud et al., 2009) and they support the notion that the effects of oxysterols on the biophysical properties of cell membranes could explain, at least in part, some of their biological activities (Olkkonen and Hynynen, 2009). By analogy with the data obtained on 7KC-treated U937 cells, it is suggested that 7KC and 24S-OHC could also favor the down-regulation of the PI3-K/PDK-1/Akt signaling pathway in 158N cells. This pathway is closely associated with the cytoplasmic membrane and involved in the control of several life and death signals (Datta et al., 1999). Cytoplasmic membrane disorganization measured with MC540 has also been reported in C24:0-treated U937 cells (Kahn et al., 2011). Thus, the disorganization of membrane lipids observed in cells treated with 7KC, 24S-OHC, and C24:0 could be a general phenomenon independent of the cell type and of the species considered. Consequently, alterations in plasma membranes could contribute to the impaired functionality of numerous receptors and ionic transporters in numerous cell types, including brain cells. In addition, as 7KC-, 24S-OHC and VLCFA are potent inducers of oxidative stress in 158N cells (Baarine et al., 2012a; Nury et al., 2015), ROS overproduction (via protein carbonylation, and lipid peroxidation leading to modifications of the physico-chemical properties of the plasma membrane) could also modify

the functionality of ion channels (Kiselyov and Muallem, 2016). Evidence that ROS modulation of K^+ channels is causative in the progression of neurodegenerative disease is still lacking whereas the contribution of K^+ channel modulation in such diseases is widely suspected. Indeed, in the nematode, *Caenorhabditis elegans*, oxidation of K^+ channels by ROS is a major mechanism underlying the loss of neuronal function (Sesti et al., 2010). It was therefore of interest to investigate the impact of 7KC, 24S-OHC, and VLCFA on $[K^+]_i$.

Using complementary techniques to quantify $[K^+]_i$, including fluorometry and flame photometry, our data establish for the first time that 7KC and 24S-OHC, as well as C24:0, increase $[K^+]_i$. Whether or not the intracellular accumulation of K^+ constitutes an early or late event in cell death has yet to be determined, as does its contribution to the cell death process. In agreement with previous investigations, an apoptotic mode of cell death, characterized by a loss of $\Delta\Psi_m$, increased cytoplasmic membrane permeability to PI, cleaved-caspase-3, increased percentages of SubG1 cells and of cells with condensed and/or fragmented nuclei, was observed in 158N cells treated with 7KC and 24S-OHC (Nury et al., 2015), whereas a necrosis mode of cell death, characterized by a loss of $\Delta\Psi_m$, increased cytoplasmic membrane permeability to PI, and an increased proportion of cells with swollen and/or irregular nuclei, was found in 158N cells treated with C24:0 (Kahn et al., 2011). Our data established that the intracellular accumulation of K^+ does not depend on the mode of cell death and they suggest that activation of ion channels and pores could be essential steps during cell death (Kunzelmann, 2016). As the intracellular level of K^+ correlated positively with cell death, and as the use of 4-AP alone triggered cell death and increased 7KC- and 24S-OHC-induced apoptosis as well as C24:0-induced necrosis, our data demonstrate that blockage of the Kv channels plays critical roles in cell death induction and is able to exacerbate lipotoxicity.

Consequently, a better understanding of K^+ homeostasis in neurodegenerative diseases associated with enhanced levels of oxysterols and/or VLCFA could help to improve our knowledge about neurodegeneration and allow us to develop new treatments. The widely used antidepressant, fluoxetine, like 4-AP, has been described to inhibit Kv potassium current (Yeung et al., 1999; Chen et al., 2015). In addition, it has been reported that fluoxetine and its major metabolite, norfluoxetine, can block the Kv3.1 channel (Choi et al., 2001; Sung et al., 2008). Docosahexaenoic acid (DHA) has also been reported to selectively modulate the activity of certain voltage-gated K^+ channels (Kv1.2, Kv3.1a) (Poling et al., 1995; Poling et al., 1996). It is therefore questionable whether elevated levels of 7KC, 24S-OHC and C24:0 in the presence of other compounds which could favor the intracellular accumulation of K^+ , might exacerbate lipotoxicity and increase the risk of developing demyelinating or non-demyelinating neurodegenerative diseases. Thus, in X-ALD, it could be of interest to determine whether associated events able to enhance $[K^+]_i$ could increase the cytotoxicity of VLCFA and favor the conversion of the childhood-onset cerebral demyelinating inflammatory type (CCALD) into the adulthood-onset type with focal cerebral demyelination (ACALD), which is rapidly fatal. Indeed, at the moment, the events able to trigger the conversion of CCALD into ACALD are still unknown, and their identification is crucial to develop appropriate therapies able to prevent the evolution of the disease (Engelen et al., 2014). The importance of K^+ dependent signaling was emphasized in the context of X-ALD with 25-OHC (Jang et al., 2016). 25-OHC mediates the neuro-inflammation of X-ALD via activation of the NLRP3 inflammasome which requires K^+ efflux (Jang et al., 2016). Similar mechanisms, connected with 25-OHC or other cholesterol derivatives, cannot be excluded in MS (Crick et al., 2016). In addition, as little is known about the eventual relationships between depression and

neurodegeneration (Kim et al., 2016), it could be of interest to determine in patients with demyelinating or non-demyelinating neurodegenerative diseases associated with enhanced levels of 7KC, 24S-OHC, and/or C24:0 whether the use of anti-depressant drugs (such as fluoxetine known to inhibit Kv potassium current) has an impact, by delaying or accelerating the progression of these diseases. Interestingly, as sustained-release fampridine, a slow release formulation of 4-AP, is widely used for the treatment of walking difficulties in MS, and is considered as efficient for the symptomatic management of this disease (Hadavi et al., 2017), it can be considered that the ability to regulate K^+ homeostasis in nerve and immune cells of MS patients could be a challenge for future treatments which would be capable, if not to cure the disease, at least to increase the quality of life of patients.

In conclusion, our data obtained in 158N murine oligodendrocytes show that oxysterols (7KC, 24S-OHC)-induced apoptosis and VLCFA (C24:0)-induced necrosis are associated with major modifications of the cytoplasmic membrane, which could contribute to intracellular K^+ retention. Interestingly, exacerbated lipotoxicity was observed in cells treated with the universal Kv channels blocker, 4-AP. The positive correlation between $[K^+]_i$ and cell death supports the potential involvement of K^+ in 7KC-, 24S-OHC-, and C24:0-induced cytotoxicity. This suggests that the lipid profile of biological fluids and tissues of patients with neurodegenerative diseases, especially the content in 7KC, 24S-OHC, and C24:0, could impact the functionally and/or the expression of Kv channels (involved in the efflux of K^+ and thus in the control of intracellular K^+ homeostasis) and consequently affect the activities of nerve cells and the transmission of nerve impulses.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

This work was presented as a poster at the 6th ENOR symposium 'Translational Research on Oxysterols' September 29–30, 2016–at Paris Descartes University – France (ENOR's website; <http://oxysterols.com/>). This work was supported by grants from: Univ. Bourgogne (Dijon, France), Univ. El Manar (Tunis, Tunisia), ASSAD (Louhans, France) and the Departments of Neurology (Prof. Thibault Moreau, University Hospital, Dijon, France; Prof. Jérôme de Sèze, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France). We wish to thank Dr. Afef Bahlous, for his help with flame photometry experimental setting; the technical support of Ms. Nejla Labben is gratefully acknowledged. We also acknowledge Dr Jean-Paul Pais de Barros and Ms Victoria Bergas (Plateforme de Lipidomique, Dijon, France) for the quantification of 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol, and C24:0 by gas chromatography coupled with mass spectrometry. We also thank Mr Philip Bastable for English corrections.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.03.006>.

References

- Andersson, B., Janson, V., Behnam-Motlagh, P., Henriksson, R., Grankvist, K., 2006. Induction of apoptosis by intracellular potassium ion depletion: using the fluorescent dye PBFI in a 96-well plate method in cultured lung cancer cells. *Toxicol. In Vitro* 20, 986–994.
- Ares, M.P., Pörn-Ares, M.I., Moses, S., Thyberg, J., Juntti-Berggren, L., Berggren, P., Hultgårdh-Nilsson, A., Kallin, B., Nilsson, J., 2000. 7beta-hydroxycholesterol

- induces Ca²⁺ oscillations: MAP kinase activation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 153, 23–35.
- Arnauld, S., Fidaleo, M., Clémencet, M.C., Chevillard, G., Athias, A., Gresti, J., Wanders, R.J., Latruffe, N., Nicolas-Francès, V., Mandard, S., 2009. Modulation of the hepatic fatty acid pool in peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase B-null mice exposed to the selective PPAR α agonist Wy14,643. *Biochimie* 91, 1376–1386.
- Baarine, M., Ragot, K., Genin, E.C., El Hajj, H., Tromprier, D., Andreoletti, P., Ghandour, M.S., Menétrier, F., Cherkaoui-Malki, M., Savary, S., Lizard, G., 2009. Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytic cell lines (158N: 158JP): potential models for the study of peroxisomal disorders associated with dysmyelination processes. *J. Neurochem.* 111, 119–131.
- Baarine, M., Andréoletti, P., Athias, A., Nury, T., Zarrouk, A., Ragot, K., Vejux, A., Riedinger, J.-M., Kattan, Z., Bessedé, G., Tromprier, D., Savary, S., Cherkaoui-Malki, M., Lizard, G., 2012a. Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid-treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins. *Neuroscience* 213, 1–18.
- Baarine, M., Ragot, K., Athias, A., Nury, T., Kattan, Z., Genin, E.C., Andreoletti, P., Ménétrier, F., Riedinger, J.M., Bardou, M., Lizard, G., 2012b. Incidence of Abcd1 level on the induction of cell death and organelle dysfunctions triggered by very long chain fatty acids and TNF- α on oligodendrocytes and astrocytes. *Neurotoxicology* 33, 212–228.
- Barateiro, A., Brites, D., Fernandes, A., 2016. Oligodendrocyte development and myelination in neurodevelopment: molecular mechanisms in health and disease. *Curr. Pharm. Des.* 22, 656–679.
- Barriuso, B., Ansorena, D., Astiasarán, I., 2016. Oxysterols formation: a review of a multifactorial process. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 16, 30041–30043. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.027> pii: S0960-0760.
- Baumann, N., Pham-Dinh, D., 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 81, 871–927.
- Beattie, M.E., Veatch, S.L., Stottrup, B.L., Keller, S.L., 2005. Sterol structure determines miscibility versus melting transitions in lipid vesicles. *Biophys. J.* 89, 1760–1768.
- Berthier, A., Lemaire-Ewing, S., Prunet, C., Montange, T., Vejux, A., Pais de Barros, J.P., Monier, S., Gambert, P., Lizard, G., Néel, D., 2005. 7-ketocholesterol-induced apoptosis. Involvement of several pro-apoptotic but also anti-apoptotic calcium-dependent transduction pathways. *FEBS J.* 272, 3093–3104.
- Beznan, L., Moser, H.W., 1998. Incidence of X-linked adrenoleukodystrophy and the relative frequency of its phenotypes. *Am. J. Med. Genet.* 76, 415–419.
- Björkhem, I., 2006. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *Intern. Med.* 260, 493–508.
- Boenzi, S., Deodato, F., Taurisano, R., Goffredo, B.M., Rizzo, C., Dionisi-Vici, C., 2016. Evaluation of plasma cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol and 7-ketocholesterol in inherited disorders related to cholesterol metabolism. *Lipid Res.* 57, 361–367.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J., Ciccolini, F., Lipp, P., 2001. Calcium signalling—an overview. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 3–10.
- Broom, D.C., Matson, D.J., Bradshaw, E., Buck, M.E., Meade, R., Coombs, S., Matchett, M., Ford, K.K., Yu, W., Yuan, J., Sun, S.H., Ochoa, R., Krause, J.E., Wustrow, D.J., Cortright, D.N., 2008. Characterization of N-(adamantan-1-ylmethyl)-5-[(3R)-amino-pyrrolidin-1-yl]methyl]-2-chloro-benzamide, a P2X7 antagonist in animal models of pain and inflammation. *Pharmacol. Exp. Ther.* 327, 620–633.
- Chen, C., Wang, L., Rong, X., Wang, W., Wang, X., 2015. Effects of fluoxetine on protein expression of potassium ion channels in the brain of chronic mild stress rats. *Acta Pharm. Sin. B* 5, 55–61.
- Choi, B.H., Choi, J.S., Yoon, S.H., Rhie, D.J., Min, D.S., Jo, Y.H., Kim, M.S., Hahn, S.J., 2001. Effects of norfluoxetine, the major metabolite of fluoxetine, on the cloned neuronal potassium channel Kv3.1. *Neuropharmacology* 41, 443–453.
- Cotrina, M.L., Nedergaard, M., 2009. Physiological and pathological functions of P2X7 receptor in the spinal cord. *Purinergic Signal.* 5, 223–232.
- Crick, P.J., Griffiths, W.J., Zhang, J., Beibel, M., Abdel-Khalik, J., Kuhle, J., Sailer, A.W., Wang, Y., 2016. Reduced plasma levels of 25-hydroxycholesterol and increased cerebrospinal fluid levels of bile acid precursors in multiple sclerosis patients. *Mol. Neurobiol.* PubMed PMID: 27878760.
- Díaz-Hernández, M., Díez-Zaera, M., Sánchez-Nogueiro, J., Gómez-Villafuertes, R., Canals, J.M., Alberch, J., Miras-Portugal, M.T., Lucas, J.J., 2009. Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J.* 23, 1893–1906.
- Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E., 1999. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev.* 13, 2905–2927.
- Debbabi, M., Nury, T., Zarrouk, A., Mekahli, N., Bezine, M., Sghaier, R., Grégoire, S., Martine, L., Durand, P., Camus, E., Vejux, A., Jabrane, A., Bretillon, L., Prost, M., Moreau, T., Ammou, S.B., Hammami, M., Lizard, G., 2016. Protective effects of α -tocopherol, γ -tocopherol and oleic acid, three compounds of olive oils, and no effect of trolox, on 7-ketocholesterol-induced mitochondrial and peroxisomal dysfunction in microglial BV-2 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (12).
- Doria, M., Maugest, L., Moreau, T., Lizard, G., Vejux, A., 2016. Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 101, 393–400.
- Duran, M.J., Pierre, S.V., Lesnik, P., Pieroni, G., Bourdeaux, M., Dignat-Georges, F., Sampol, J., Maixent, J.M., 2010. 7-ketocholesterol inhibits Na, K-ATPase activity by decreasing expression of its α 1-subunit and membrane fluidity in human endothelial cells. *Cell Mol. Biol.* 56 (Suppl), OL1434–OL1441.
- El-Sayyad, H.I., 2015. Cholesterol overload impairing cerebellar function: the promise of natural products. *Nutrition* 31, 621–630.
- Engelen, M., Kemp, S., de Visser, M., van Geel, B.M., Wanders, R.J.A., Aubourg, P., Poll-The, B.T., 2012. X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet J. Rare Dis.* 7, 51.
- Engelen, M., Kemp, S., Poll-The, B.T., 2014. X-linked adrenoleukodystrophy: pathogenesis and treatment. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 14, 486.
- Feutz, A.C., Pham-Dinh, D., Allinquant, B., Miehle, M., Ghandour, M.S., 2001. An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway. *Glia* 34, 241–252.
- Giudetti, A.M., Romano, A., Lavecchia, A.M., Gaetani, S., 2016. The role of brain cholesterol and its oxidized products in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 13, 198–205.
- Graham, S.F., Nasaruddin, M.B., Carey, M., McGuinness, B., Holscher, C., Kehoe, P.G., Love, S., Passmore, A.P., Elliott, C.T., Meharg, A., Green, B.D., 2015. Quantitative measurement of [Na⁺] and [K⁺] in postmortem human brain tissue indicates disturbances in subjects with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Alzheimers Dis.* 44, 851–857.
- Grisser, S., Nguyen, A.N., Aiyar, J., Hanson, D.C., Mather, R.J., Gutman, G.A., Kamilowicz, M.J., Auperin, D.D., Chandry, K.G., 1994. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol. Pharmacol.* 45, 1227–1234.
- Hadavi, S., Baker, M.D., Dobson, R., 2017. Sustained-release fampridine in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 3, 17–21.
- Hammoud, Y., Rice, T., Mackrill, J.J., 2013. Oxysterols modulate calcium signalling in the A7r5 aortic smooth muscle cell-line. *Biochimie* 95, 568–577.
- Hascalovic, J.R., Vaya, J., Khatib, S., Holcroft, C.A., Zukor, H., Song, W., Arvanitakis, Z., Bennett, D.A., Schipper, H.M., 2009. Brain sterol dysregulation in sporadic AD and MCI: relationship to heme oxygenase-1. *J. Neurochem.* 110, 1241–1253.
- Hein, S., Schönfeld, P., Kahlert, S., Reiser, G., 2008. Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1750–1761.
- Heverin, M., Bogdanovic, N., Lütjohann, D., Bayer, T., Pikuleva, I., Bretillon, L., Diczfalusy, U., Winblad, B., Björkhem, I., 2004. Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.* 45, 186–193.
- Hu, H., Zhou, Y., Leng, T., Liu, A., Wang, Y., You, X., Chen, J., Tang, L., Chen, W., Qiu, P., Yin, W., Huang, Y., Zhang, J., Wang, L., Sang, H., Yan, G., 2014. The major cholesterol metabolite cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol functions as an endogenous neuroprotectant. *J. Neurosci.* 34, 11426–11438.
- Huang, J.D., Amaral, J., Lee, J.W., Rodriguez, I.R., 2014. 7-Ketocholesterol-induced inflammation signals mostly through the TLR4 receptor both in vitro and in vivo. *PLoS One* 9 (7), e100985.
- Jang, J., Park, S., Hur, H. Jin, Cho, H.J., Hwang, I., Kang, Y., Pyo, Im, I., Lee, H., Lee, E., Yang, W., Kang, H.C., Kwon, S., Won, Yu, J.W., Kim, D.W., 2016. 25-hydroxycholesterol contributes to cerebral inflammation of X-linked adrenoleukodystrophy through activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat. Commun.* 7, 13129.
- Jarvis, S.E., Zamponi, G.W., 2007. Trafficking and regulation of neuronal voltage-gated calcium channels. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 474–482.
- Kahn, E., Baarine, M., Dauphin, A., Ragot, K., Tissot, N., Seguin, A., Ménétrier, F., Kattan, Z., Bachelet, C.-M., Frouin, F., Lizard, G., 2011. Impact of 7-ketocholesterol and very long chain fatty acids on oligodendrocyte lipid membrane organization: evaluation via LAURDAN and FAMIS spectral image analysis. *Cytom. A* 79, 293–305.
- Kannenberg, F., Nofer, J.R., Schulte, E., Reunert, J., Marquardt, T., Fobker, M., 2016. Determination of serum cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol by gas chromatography-mass spectrometry for identification of Niemann-Pick type C (NPC) disease. *Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2016 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.030> pii: S0960-0760(16)30044-9.
- Kasner, S.E., Ganz, M.B., 1992. Regulation of intracellular potassium in mesangial cells: a fluorescence analysis using the dye, PBFI. *Am. J. Physiol.* 262, F462–467.
- Kim, J., Sasaki, Y., Yoshida, W., Kobayashi, N., Veloso, A.J., Kerman, K., Ikebukuro, K., Sode, K., 2013. Rapid cytotoxicity screening platform for amyloid inhibitors using a membrane-potential sensitive fluorescent probe. *Anal. Chem.* 85, 185–192.
- Kim, H.K., Nunes, P.V., Oliveira, K.C., Young, L.T., Lafer, B., 2016. Neuropathological relationship between major depression and dementia: a hypothetical model and review. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 67, 51–57.
- Kim, S.M., Noh, M.Y., Kim, H., Cheon, S.Y., Lee, K.M., Lee, J., Cha, E., Park, K.S., Lee, K.W., Sung, J.J., Kim, S.H., 2017. 25-Hydroxycholesterol is involved in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Oncotarget* doi:<http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.14416>.
- Kiselyov, K., Muallem, S., 2016. ROS and intracellular ion channels. *Cell Calcium* 60, 108–114.
- Kitayama, S., Ohtsuki, H., Morita, K., Dohi, T., Tsujimoto, A., 1990. Bis-oxonol experiment on plasma membrane potentials of bovine adrenal chromaffin cells: depolarizing stimuli and their possible interaction. *Neurosci. Lett.* 116, 275–279.
- Klinke, G., Rohrbach, M., Giugliani, R., Burda, P., Baumgartner, M.R., Tran, C., Gautschi, M., Mathis, D., Hersberger, M., 2015. LC-MS/MS based assay and reference intervals in children and adolescents for oxysterols elevated in Niemann-Pick diseases. *Clin. Biochem.* 48, 596–602.
- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozana, A., Adachi, H., et al., 2017. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy, 3rd edition. *Autophagy*, vol. 12, , pp. 1–222.

- Kondratskiy, A., Kondratska, K., Skryma, R., Prevarskaya, N., 2015. Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1848 (10 Pt B), 2532–2546.
- Kou, J., Kovacs, G.G., Höftberger, R., Kulik, W., Brodde, A., Forss-Petter, S., Högnisch, S., Gleiss, A., Brügger, B., Wanders, R., Just, W., Budka, H., Jungwirth, S., Fischer, P., Berger, J., 2011. Peroxisomal alterations in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 122, 271–283.
- Kreilaus, F., Spiro, A.S., McLean, C.A., Garner, B., Jenner, A.M., 2016. Evidence for altered cholesterol metabolism in Huntington's disease post mortem brain tissue. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 42, 535–546.
- Kruska, N., Schönfeld, P., Pujol, A., Reiser, G., 2015. Astrocytes and mitochondria from adrenoleukodystrophy protein (ABCD1)-deficient mice reveal that the adrenoleukodystrophy-associated very long-chain fatty acids target several cellular energy-dependent functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 925–936.
- Kumar, A., Kumari, S., Majhi, R.K., Swain, N., Yadav, M., Goswami, C., 2015. Regulation of TRP channels by steroids: implications in physiology and diseases. *Gen. Comp. Endocrinol.* 220, 23–32.
- Kumar, P., Kumar, D., Jha, S.K., Jha, N.K., Ambasta, R.K., 2016. Ion channels in neurological disorders. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 103, 97–136.
- Kunzelmann, K., 2016. Ion channels in regulated cell death. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 2387–2403.
- Laakko, T., King, L., Fraker, P., 2002. Versatility of merocyanine 540 for the flow cytometric detection of apoptosis in human and murine cells. *J. Immunol. Methods* 261, 129–139.
- Lahet, J.J., Lenfant, F., Courderot-Masuyer, C., Bouyer, F., Lecordier, J., Bureau, A., Freysz, M., Chaillot, B., 2007. Comparison of three methods for oxidative stress-induced potassium efflux measurement. *Biomed. Pharmacother.* 61, 423–426.
- Langner, M., Hui, S.W., 1993. Merocyanine interaction with phosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1149, 175–179.
- Lee, C.S., Park, W.J., Han, E.S., Bang, H., 2007. Differential modulation of 7-ketocholesterol toxicity against PC12 cells by calmodulin antagonists and Ca²⁺ channel blockers. *Neurochem. Res.* 32, 87–98.
- Lemaire-Ewing, S., Berthier, A., Royer, M.C., Logette, E., Corcos, L., Bouchot, A., Monier, S., Prunet, C., Raveneau, M., Rébé, C., Desrumaux, C., Lizard, G., Néel, D., 2009. 7beta-Hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 secretion involves a calcium-dependent activation of c-fos via the ERK1/2 signaling pathway in THP-1 cells: oxysterols-induced IL-8 secretion is calcium-dependent. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 127–139.
- Leoni, V., Masterman, T., Diczfalusy, U., De Luca, G., Hillert, J., Björkhem, I., 2002. Changes in human plasma levels of the brain specific oxysterol 24S-hydroxycholesterol during progression of multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 331, 163–166.
- Leoni, V., Nury, T., Vejux, A., Zarrouk, A., Caccia, C., Debbabi, M., Fromont, A., Sghaier, R., Moreau, T., Lizard, G., 2016. Mitochondrial dysfunctions in 7-ketocholesterol-treated 158N oligodendrocytes without or with α -tocopherol: impacts on the cellular profile of tricarboxylic cycle-associated organic acids, long chain saturated and unsaturated fatty acids, oxysterols, cholesterol and cholesterol precursors. *Steroid Biochem. Mol. Biol.* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.029.
- Li, F., Tsien, J.Z., 2009. Memory and the NMDA receptors. *N. Engl. J. Med.* 361, 302–303.
- Liu, D., Pitta, M., Lee, J.H., Ray, B., Lahiri, D.K., Furukawa, K., Mughal, M., Jiang, H., Villarreal, J., Cutler, R.G., Greig, N.H., Mattson, M.P., 2010. The KATP channel activator diazoxide ameliorates amyloid- β and tau pathologies and improves memory in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dis.* 22, 443–457.
- Lizard, G., Fournel, S., Genestier, L., Dhedin, N., Chaput, C., Flacher, M., Mutin, M., Panaye, G., Revillard, J.P., 1995. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry* 21, 275–283.
- Lizard, G., 2016. Generation of oxysterols formed by free radical and enzymes by electrochemical oxidation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118, 135–136.
- Lordan, S., O'Brien, N.M., Mackrill, J.J., 2009. The role of calcium in apoptosis induced by 7beta-hydroxycholesterol and cholesterol-5beta, 6beta-epoxide. *Biochem. Mol. Toxicol.* 23, 324–332.
- Mackrill, J.J., 2011. Oxysterols and calcium signal transduction. *Chem. Phys. Lipids* 164, 488–495.
- Millanvoye-Van Brussel, E., Topal, G., Brunet, A., Do Pham, T., Deckert, V., Rendu, F., David-Dufilho, M., 2004. Lysophosphatidylcholine and 7-oxocholesterol modulate Ca²⁺ signals and inhibit the phosphorylation of endothelial NO synthase and cytosolic phospholipase A2. *Biochem. J.* 380, 533–539.
- Monier, S., Samadi, M., Prunet, C., Denance, M., Laubriet, A., Athias, A., Berthier, A., Steinmetz, E., Jürgens, G., Nègre-Salvyre, A., Bessède, G., Lemaire-Ewing, S., Néel, D., Gambert, P., Lizard, G., 2003. Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7beta hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 814–824.
- Morley, J.E., Banks, W.A., 2010. Lipids and cognition. *Alzheimers Dis.* 20, 737–747.
- Moyano, A.L., Pituch, K., Li, G., van Breemen, R., Mansson, J.E., Givogri, M.I., 2013. Levels of plasma sulfatides C18:0 and C24:1 correlate with disease status in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neurochem.* 127, 600–604.
- Mukhopadhyay, S., Fellows, K., Browne, R.W., Khare, P., Krishnan Radhakrishnan, S., Hagemeyer, J., Weinstock-Guttman, B., Zivadinov, R., Ramanathan, M., 2016. Interdependence of oxysterols with cholesterol profiles in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* doi:http://dx.doi.org/10.1177/1352458516666187.
- Mutemberezi, V., Guillemot-Legris, O., Muccioli, G.G., 2016. Oxysterols: from cholesterol metabolites to key mediators. *Prog. Lipid Res.* 64, 152–169.
- Novakova, L., Axelsson, M., Malmeström, C., Zetterberg, H., Björkhem, I., Karenbauer, V.D., Lycke, J., 2015. Reduced cerebrospinal fluid concentrations of oxysterols in response to natalizumab treatment of relapsing remitting multiple sclerosis. *Neurol. Sci.* 358, 201–206.
- Nury, T., Zarrouk, A., Mackrill, J.J., Samadi, M., Durand, P., Riedinger, J.-M., Doria, M., Vejux, A., Limagne, E., Delmas, D., Prost, M., Moreau, T., Hammami, M., Delage-Mourroux, R., O'Brien, N.M., Lizard, G., 2015. Induction of oxiaoptoptology on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7 β -hydroxycholesterol-, or 24(S)-hydroxycholesterol: protective effects of α -tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3). *Steroids* 99, 194–203.
- Nury, T., Zarrouk, A., Ragot, K., Debbabi, M., Riedinger, J.-M., Vejux, A., Aubourg, P., Lizard, G., 2016. 7-Ketocholesterol is increased in the plasma of X-ALD patients and induces peroxisomal modifications in microglial cells: potential roles of 7-ketocholesterol in the pathophysiology of X-ALD. *Steroid Biochem. Mol. Biol.* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.037.
- Olivier, E., Dutot, M., Regazzetti, A., Dargère, D., Auzel, N., Laprèvote, O., Rat, P., 2016a. Lipid deregulation in UV irradiated skin cells: role of 25-hydroxycholesterol in keratinocyte differentiation during photoaging. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.05.015.
- Olivier, E., Dutot, M., Regazzetti, A., Leguillier, T., Dargère, D., Auzel, N., Laprèvote, O., Rat, P., 2016b. P2X7-pannexin-1 and amyloid (-induced oxysterol input in human retinal cell: role in age-related macular degeneration? *Biochimie* 127, 70–78.
- Olkkonen, V.M., Hynynen, R., 2009. Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Mol. Asp. Med.* 30, 123–133.
- Panini, S.R., Sinensky, M.S., 2001. Mechanisms of oxysterol-induced apoptosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 529–533.
- Paul, S.M., Doherty, J.J., Robichaud, A.J., Belfort, G.M., Chow, B.Y., Hammond, R.S., Crawford, D.C., Linsenhardt, A.J., Shu, H.-J., Izumi, Y., Mennerick, S.J., Zorumski, C.F., 2013. The major brain cholesterol metabolite 24(S)-hydroxycholesterol is a potent allosteric modulator of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurosci.* 33, 17290–17300.
- Petrov, A.M., Kasimov, M.R., Zefirov, A.L., 2016. Brain cholesterol metabolism and its defects: linkage to neurodegenerative diseases and synaptic dysfunction. *Acta Nat.* 8, 58–73.
- Poling, J.S., Karanian, J.W., Salem, N., Vicini, S., 1995. Time- and voltage-dependent block of delayed rectifier potassium channels by docosahexaenoic acid. *Mol. Pharmacol.* 47, 381–390.
- Poling, J.S., Vicini, S., Rogawski, M.A., Salem Jr., N., 1996. Docosahexaenoic acid block of neuronal voltage-gated K⁺ channels: subunit selective antagonism by zinc. *Neuropharmacology* 35, 969–982.
- Porter, F.D., Scherrer, D.E., Lanier, M.H., Langmade, S.J., Molugu, V., Gale, S.E., Olzeski, D., Sidhu, R., Dietzen, D.J., Fu, R., Wassif, C.A., Yanjanin, N.M., Marso, S.P., House, J., Vite, C., Schaffer, J.E., Ory, D.S., 2010. Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *Sci. Transl. Med.* 2 (56), 56ra81.
- Ragot, K., Mackrill, J.J., Zarrouk, A., Nury, T., Aires, V., Jacquin, A., Athias, A., de Barros, J.-P. Pais, Vejux, A., Riedinger, J.-M., Delmas, D., Lizard, G., 2013. Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes. *Biochem. Pharmacol.* 86, 67–79.
- Ramasamy, S., Boissonneault, G.A., Hennig, B., 1992. Oxysterol-induced endothelial cell dysfunction in culture. *J. Am. Coll. Nutr.* 11, 532–538.
- Roberts, B.R., Doecke, J.D., Rembach, A., Yévenes, L.F., Fowler, C.J., McLean, C.A., Lind, M., Volitakis, I., Masters, C.L., Bush, A.I., Hare, D.J., 2016. Rubidium and potassium levels are altered in Alzheimer's disease brain and blood but not in cerebrospinal fluid. *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 119.
- Roger, S., Pelegrin, P., Surprenant, A., 2008. Facilitation of P2X7 receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding. *J. Neurosci.* 28, 6393–6401.
- Romanello, M., Zampieri, S., Bortolotti, N., Deroma, L., Sechi, A., Fiumara, A., Parini, R., Borroni, B., Brancati, F., Bruni, A., Russo, C.V., Bordugo, A., Bembi, B., Dardis, A., 2016. Comprehensive evaluation of plasma 7-ketocholesterol and cholestan-3 β , 5 α , 6 β -Triol in an Italian cohort of patients affected by niemann-pick disease due to NPC1 and SMPD1 mutations. *Clin. Chim. Acta* 455, 39–45.
- Ryan, L., O'Callaghan, Y.C., O'Brien, N.M., 2006. Involvement of calcium in 7beta-hydroxycholesterol and cholesterol-5beta, 6beta-epoxide-induced apoptosis. *Int. J. Toxicol.* 25, 35–39.
- Sanz, J.M., Chiozzi, P., Ferrari, D., Colaianna, M., Idzko, M., Falzoni, S., Fellin, R., Trabace, L., Di Virgilio, F., 2009. Activation of microglia by amyloid [beta] requires P2X7 receptor expression. *J. Immunol.* 182, 4378–4385.
- Savary, S., Trompier, D., Andréoletti, P., Le Borgne, F., Demarquois, J., Lizard, G., 2012. Fatty acids – induced lipotoxicity and inflammation. *Curr. Drug Metab.* 13, 1358–1370.
- Schlegel, R.A., Stevens, M., Lumley-Sapanski, K., Williamson, P., 1993. Altered lipid packing identifies apoptotic thymocytes. *Immunol. Lett.* 36, 283–288.
- Senanayake, V.K., Jin, W., Mochizuki, A., Chitou, B., Goodenow, D.B., 2015. Metabolic dysfunctions in multiple sclerosis: implications as to causation, early detection, and treatment, a case control study. *BMC Neurol.* 15 (154).
- Sesti, F., Liu, S., Cai, S.Q., 2010. Oxidation of potassium channels by ROS: a general mechanism of aging and neurodegeneration? *Trends Cell Biol.* 20, 45–51.
- Sesti, F., 2016. Oxidation of K(+) channels in aging and neurodegeneration. *Aging Dis.* 7, 130–135.
- Singh, I., Moser, A.E., Moser, H.W., Kishimoto, Y., 1984. Adrenoleukodystrophy: impaired oxidation of very long chain fatty acids in white blood cells, cultured skin fibroblasts, and amniocytes. *Pediatr. Res.* 18, 286–290.

- Sun, M.Y., Izumi, Y., Benz, A., Zorumski, C.F., Mennerick, S., 2016. Endogenous 24S-hydroxycholesterol modulates NMDAR-mediated function in hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 115, 1263–1272.
- Sung, M.J., Ahn, H.S., Hahn, S.J., Choi, B.H., 2008. Open channel block of Kv3.1 currents by fluoxetine. *J. Pharmacol. Sci.* 106, 38–45.
- Tang, L., Wang, Y., Leng, T., Sun, H., Zhou, Y., Zhu, W., Qiu, P., Zhang, J., Lu, B., Yan, M., Chen, W., Su, X., Yin, W., Huang, Y., Hu, H., Yan, G., 2015. Cholesterol metabolite cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol suppresses epileptic seizures by negative modulation of voltage-gated sodium channels. *Steroids* 98, 166–172.
- Testa, G., Staurengi, E., Zerbinati, C., Gargiulo, S., Iuliano, L., Giaccone, G., Fantò, F., Poli, G., Leonarduzzi, G., Gamba, P., 2016. Changes in brain oxysterols at different stages of Alzheimer's disease: their involvement in neuroinflammation. *Redox Biol.* 10, 24–33.
- Tewari, M., Seth, P., 2015. Emerging role of P2X7 receptors in CNS health and disease. *Ageing Res. Rev.* 24, 328–342.
- Vejuh, A., Lizard, G., 2009. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol. Asp. Med.* 30, 153–170.
- Vejuh, A., Guyot, S., Montange, T., Riedinger, J.-M., Kahn, E., Lizard, G., 2009. Phospholipidosis and down-regulation of the PI3-K/PDK-1/Akt signalling pathway are vitamin E inhibitable events associated with 7-ketocholesterol-induced apoptosis. *Nutr. Biochem.* 20, 45–61.
- Verhoef, P.A., Estacion, M., Schilling, W., Dubyak, G.R., 2003. P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases caspases, and IL-1 beta release. *J. Immunol.* 170, 5728–5738.
- Vitvitsky, V.M., Garg, S.K., Keep, R.F., Albin, R.L., Banerjee, R., 2012. Na⁺ and K⁺ ion imbalances in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1671–1681.
- Wald, T., Petry-Podgorska, I., Fiser, R., Matousek, T., Dedina, J., Osicka, R., Sebo, P., Masin, J., 2014. Quantification of potassium levels in cells treated with Bordetella adenylate cyclase toxin. *Anal. Biochem.* 450, 57–62.
- Weber, D., Ni, Z., Vetter, D., Hoffmann, R., Fedorova, M., 2016. Electrochemical oxidation of cholesterol: an easy way to generate numerous oxysterols in short reaction times. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118, 325–331.
- Wood, W.G., Li, L., Müller, W.E., Eckert, G.P., 2014. Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *J. Neurochem.* 129, 559–572.
- Yamaguchi, M., Tomiyama, Y., Katayama, T., Kitahata, H., Oshita, S., 2005. Involvement of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the response of membrane potential to hyperosmolality in cultured human aorta endothelial cells. *Anesth. Analg.* 100, 419–426.
- Yeung, S.Y., Millar, J.A., Mathie, A., 1999. Inhibition of neuronal KV potassium currents by the antidepressant drug, fluoxetine. *Br. J. Pharmacol.* 128, 1609–1615.
- Yoshida, Y., Kodai, S., Takemura, S., Minamiyama, Y., Niki, E., 2008. Simultaneous measurement of F2-isoprostane, hydroxyoctadecadienoic acid, hydroxyeicosatetraenoic acid, and hydroxycholesterols from physiological samples. *Anal. Biochem.* 379, 105–115.
- Zarrouk, A., Vejuh, A., Nury, T., El Hajj, H.I., Haddad, M., Cherkaoui-Malki, M., Riedinger, J.-M., Hammami, M., Lizard, G., 2012. Induction of mitochondrial changes associated with oxidative stress on very long chain fatty acids (C22:0, C24:0, or C26:0)-treated human neuronal cells (SK-NB-E). *Oxid. Med. Cell Longev.* 623257.
- Zarrouk, A., Vejuh, A., Mackrill, J., O'Callaghan, Y., Hammami, M., O'Brien, N., Lizard, G., 2014. Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Res. Rev.* 18, 148–162.
- Zarrouk, A., Nury, T., Dauphin, A., Frère, P., Riedinger, J.-M., Bachelet, C.-M., Frouin, F., Moreau, T., Hammami, M., Kahn, E., Lizard, G., 2015a. Impact of C24:0 on actin-microtubule interaction in human neuronal SK-N-BE cells: evaluation by FRET confocal spectral imaging microscopy after dual staining with rhodamine-phalloidin and tubulin tracker green. *Funct. Neurol.* 30, 33–46.
- Zarrouk, A., Nury, T., Samadi, M., O'Callaghan, Y., Hammami, M., O'Brien, N.M., Lizard, G., Mackrill, J.J., 2015b. Effects of cholesterol oxides on cell death induction and calcium increase in human neuronal cells (SK-N-BE) and evaluation of the protective effects of docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3). *Steroids* 99, 238–247.
- Zarrouk, A., Riedinger, J.M., Ahmed, S.H., Hammami, S., Chaabane, W., Debbabi, M., Ben Ammou, S., Rouaud, O., Frih, M., Lizard, G., Hammami, M., 2015c. Fatty acid profiles in demented patients: identification of hexacosanoic acid (C26:0) as a blood lipid biomarker of dementia. *J. Alzheimers Dis.* 44, 1349–1359.
- Zhornitsky, S., McKay, K.A., Metz, L.M., Teunissen, C.E., Rangachari, M., 2016. Cholesterol and markers of cholesterol turnover in multiple sclerosis: relationship with disease outcomes. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 5, 53–65.
- Zorumski, C.F., Izumi, Y., 2012. NMDA receptors and metaplasticity: mechanisms and possible roles in neuropsychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 989–1000.
- de Lores Arnaiz, G.R., Ordieres, M.G.L., 2014. Brain Na(+), K(+)-ATPase activity in aging and disease. *Int. J. Biomed. Sci.* 10, 85–102.
- van de Kraats, C., Killestein, J., Popescu, V., Rijkers, E., Vrenken, H., Lütjohann, D., Barkhof, F., Polman, C.H., Teunissen, C.E., 2014. Oxysterols and cholesterol precursors correlate to magnetic resonance imaging measures of neurodegeneration in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 20, 412–417.



Modulation of Kv3.1b potassium channel expression and of intracellular potassium levels in 158N murine oligodendrocytes and BV-2 murine microglial cells treated with 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid (C24:0)

Journal:	<i>Journal of Cellular Biochemistry</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	BEZINE, Maryem; Univ. Tunis El Manar – Pasteur Institut, Tunis, Tunisia, Lab. 'Venoms & Therapeutic Biomolecules', DEBBABI, Meryam; Univ. Monastir, Monastir, Tunisia, LR12ES05, Lab-NAFS 'Nutrition - Functional Food & Vascular Health' NURY, Thomas; Univ. Bourgogne Franche-Comté / INSERM, Bio-peroxIL BEN KHALIFA, Rym; Univ. Tunis El Manar – Pasteur Institut, Tunis, Tunisia, Lab. 'Venoms & Therapeutic Biomolecules', ZARROUK, Amira; Univ. Monastir, Monastir, Tunisia, LR12ES05, Lab-NAFS 'Nutrition - Functional Food & Vascular Health' MAATOUG, Sonia; Univ. Tunis El Manar – Pasteur Institut, Tunis, Tunisia, Lab. 'Venoms & Therapeutic Biomolecules', DE SEZE, Jérôme; Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France, Dept Neurology MOREAU, Thibault; Univ. Hospital of Dijon, Univ. Bourgogne Franche-Comté, Dept. Neurology / EA7270, Dijon SAMADI, Mohammad; Univ. Lorraine, LCPMC-A2, ICPM, Dept of Chemistry EL HAYEB, Mohamed; Univ. Tunis El Manar – Pasteur Institut, Tunis, Tunisia, Lab. 'Venoms & Therapeutic Biomolecules', LIZARD, Gérard; Univ. Bourgogne Franche-Comté / INSERM, Bio-peroxIL
Keywords:	potassium, Kv3.1b potassium channel, 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol, tetracosanoic acid, BV-2 murine microglial cells, 158N murine oligodendrocytes

SCHOLARONE™
Manuscripts

Modulation of Kv3.1b potassium channel expression and of intracellular potassium levels in 158N murine oligodendrocytes and BV-2 murine microglial cells treated with 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid (C24:0)

Maryem Bezine ^{a,b}, Meryam Debbabi ^{a,c}, Thomas Nury ^a, Rym Ben Khalifa ^b, Amira Zarrouk ^c, Sonia Maatoug ^b, Jérôme de Sèze ^d, Thibault Moreau ^e, Mohammad Samadi ^f, Mohamed El Ayeb ^b, Gérard Lizard ^{a*}

^a Univ. Bourgogne Franche-Comté, Team ‘Biochemistry of the peroxisome, inflammation and lipid metabolism’ EA 7270 / INSERM, Dijon, France;

^b Univ. Tunis El Manar – Pasteur Institut, Lab. ‘Venoms & Therapeutic Biomolecules’, Tunis, Tunisia;

^c Univ. Monastir, LR12ES05, Lab-NAFS ‘Nutrition - Functional Food & Vascular Health’, Monastir, Tunisia;

^d Dept. Neurology, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France.

^e Dept. Neurology, Univ. Hospital of Dijon, Univ. Bourgogne Franche-Comté / EA7270, Dijon, France

^f Univ. Lorraine, LCPMC-A2, ICPM, Dept of Chemistry, Metz, France,

- *Corresponding author (Dr Gérard Lizard) at:*

Univ. Bourgogne Franche-Comté / INSERM, Faculté des Sciences Gabriel

EA7270 / Bio-PeroxiL (Biochemistry of the peroxisome, inflammation and lipid metabolism)

6, Bd Gabriel; 21 000 Dijon, FRANCE

Tel: +33 380 39 62 56

Fax: + 33 380 39 62 50

E.mail: gerard.lizard@u-bourgogne.fr

ABSTRACT


Little is known about K^+ regulation, which plays major roles in the propagation of nerve impulses, and contributes to apoptosis and inflammasome activation, two events involved in neurodegeneration. As increased levels of 7-ketocholesterol (7KC), 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) and tetracosanoic acid (C24:0) have been observed in patients with neurodegenerative diseases, we studied the effect of 24 and/or 48 h of treatment with 7KC, 24S-OHC and C24:0 on Kv3.1b potassium channel expression, intracellular K^+ level, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and plasma membrane permeability in 158N murine oligodendrocytes and BV-2 murine microglial cells. In 158N cells, whereas increased expression of Kv3.1b was only observed with 7KC and 24S-OHC but not with C24:0 at 24 h, an intracellular accumulation of K^+ was always detected. In BV-2 cells treated with 7KC, 24S-OHC and C24:0, Kv3.1b expression was only increased at 48 h; intracellular K^+ accumulation was found at 24 h with 7KC, 24S-OHC and C24:0, and only with C24:0 at 48 h. Positive correlations between Kv3.1b expression and intracellular K^+ level were observed in 158N cells in the presence of 7KC and 24S-OHC, and in 7KC-treated BV-2 cells at 48 h. Positive correlations were also found between Kv3.1b expression or the intracellular K^+ level, overproduction of reactive oxygen species, loss of transmembrane mitochondrial potential and increased plasma membrane permeability in 158N and BV-2 cells. Our data support that the lipid environment affects Kv3.1b channel expression and/or functionality, and that the subsequent rupture of K^+ homeostasis is related with oligodendrocytes and microglial cells damages.

KEYWORDS: potassium, Kv3.1b potassium channel, 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol, tetracosanoic acid, 158N murine oligodendrocytes, BV-2 murine microglial cells.

INTRODUCTION

Cumulative evidence suggests that the pathophysiology of major demyelinating and non-demyelinating neurodegenerative diseases are associated with abnormalities of lipid metabolism, which could contribute to the rupture of RedOx homeostasis, activation of inflammation, and induction of nerve cell dysfunctions, which are considered hallmarks of neurodegeneration (Wood et al., 2014; Yadav and Tiwari, 2014). There is currently evidence that cholesterol and some of its derivatives may contribute to neurodegenerative diseases. The brain is the most cholesterol-rich organ in the body (Björkhem and Meaney, 2004), about 70% of the cholesterol within the brain is in myelin, the remaining 30% of brain cholesterol is divided between glial cells (20%) and neurons (10%), mainly located in the cellular membrane (Maxfield and Tabas, 2005). In humans, the causal relationship between cholesterol and dementia needs to be clarified (Panza et al., 2006). However, this does not exclude the possibility that cholesterol transport and metabolism probably play key roles in the development of AD. Indeed, the strongest genetic risk factor for AD is *APOE-ε4* (Corder et al., 1993). Since oxysterols, which are oxygen derivatives of cholesterol (formed enzymatically and/or by auto-oxidation) (Mutemberezi et al., 2016), are thought to reflect cerebral cholesterol turnover, there has been great interest in the diagnostic and prognostic value of these metabolites in neurodegenerative diseases (Vaya and Schipper, 2007). The key role of oxysterols in AD has been strongly supported by research pointing to their involvement in modulating neuroinflammation, A β accumulation, and cell death (Gamba et al., 2015). One cholesterol oxide derivative, 24(S)-hydroxycholesterol (24S-OHC; also named cerebrosterol) could constitute a potential biomarker of neurodegeneration, especially of AD (Jeitner et al., 2011). 24S-OHC is synthesized in the brain via CYP46A1 (Lund et al., 1999), which is expressed in neurons, including hippocampal and cortical neurons involved in learning

1
2
3
4
5
6 and memory (**Russell et al., 2009**). Either decreased or increased concentrations of 24S-OHC
7
8 were found in the plasma and cerebrospinal fluid (CSF) of patients with AD. Decreased 24S-
9
10 OHC concentrations in the plasma of AD patients were attributed to brain atrophy, which could
11
12 be a consequence of the decrease in metabolically active neurons (**Solomon et al., 2009**). On the
13
14 other hand, a significant increase in 24S-OHC, correlating with an increase in the tau protein
15
16 level, has been described in the CSF of patients with mild cognitive impairment (MCI) and AD
17
18 (**Shafaati et al., 2007; Popp et al., 2013**). Higher plasma and CSF levels of 24S-OHC have also
19
20 been reported in AD patients and in patients with vascular dementia (**Lütjohann et al., 2000;**
21
22 **Leoni et al., 2013**). These data favor the hypothesis that 24S-OHC may be a good marker of
23
24 "brain health" in old age, and would be increased during the progression of AD and decrease in
25
26 later stages. As elevated concentrations of 24S-OHC induce cell death in neuronal cells (**Noguchi**
27
28 **et al., 2015; Zarrouk et al., 2015a**), it has been suggested that 24S-OHC-induced lipotoxicity
29
30 might contribute to neurodegeneration and brain atrophy (**Zarrouk et al., 2015a**). Among
31
32 oxysterols, a variety of compounds that are derived from cholesterol autoxidation were also
33
34 identified at increased levels in the frontal and occipital cortex. These included 7-ketocholesterol
35
36 (7KC), 7 α -hydroxycholesterol, 4 β -hydroxycholesterol, 5 α , 6 α -epoxycholesterol, and 5 β ,6 β -
37
38 epoxycholesterol (**Testa et al., 2016**). Increased levels of 7KC were also identified in the plasma
39
40 and/or CSF of patients with major neurodegenerative diseases such as MS (**Leoni et al., 2005;**
41
42 **Mukhopadhyay et al., 2016**), X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) (**Nury et al., 2016**), and
43
44 Niemann-Pick disease (**Boenzi et al., 2016; Romanello et al., 2016**). As 7KC is a potent inducer
45
46 of oxidative stress, inflammation and cell death, which are major events associated with major
47
48 ageing-related diseases, including AD (**Zarrouk et al., 2014**), its contribution to
49
50 neurodegeneration is widely suspected. In addition, 7KC has been shown to trigger not only
51
52 mitochondrial but also peroxisomal dysfunctions leading to increased levels of very long chain
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6  y acids (VLCFA; C_≥22), which could exacerbate brain damage (**Trompier et al., 2014**).

7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Thus, in peroxisomal leukodystrophies, resulting from either peroxisome biogenesis disorders or single peroxisomal enzyme deficiencies (**Trompier et al., 2014**), increased levels of VLCFA, especially C24:0 and C26:0, are observed in the plasma and tissues of patients (**Takemoto et al., 2003**). In the cortical region of patients with AD at the stage V–VI of the disease, an accumulation of C22:0 as well as of C24:0 and C26:0, which are substrates for peroxisomal β -oxidation (**Wanders et al., 2010**), have been found (**Kou et al., 2011**). In addition, the level of plasmalogens (etherphospholipids), which need intact peroxisomes for their biosynthesis (**Brites et al., 2004; Braverman & Moser, 2012**), was decreased in severely affected tissues (**Kou et al., 2011**), which is in agreement with peroxisomal dysfunctions (**Wanders, 2014**). In the erythrocytes and plasma of patients with AD, increased levels of C26:0 were also observed, thus suggesting that peroxisomal dysfunctions and/or alterations of desaturase and elongase activities may contribute to cognitive dysfunctions (**Astarita et al., 2011; Zarrouk et al., 2015b**). Moreover, increased levels of VLCFA have also been described in the relapsing remitting and secondary progressive forms of MS (**Senanayake et al., 2015**).

At the moment, several data indicate that 7KC, 24S-OHC and C24:0 are potent inducers of neurodegeneration, mainly via their ability to promote overproduction of reactive oxygen species (ROS) (**Zarrouk et al., 2014; Testa et al., 2016; Schönfeld and Reiser, 2016**), which could subsequently contribute to inflammation and cell death (**Singh et Pujol, 2010; Trompier et al., 2014**). However, little is known about their ability to disturb ionic homeostasis, which is involved in major biological processes necessary for the proper functioning of the central and peripheral nervous system, such as signal transmission and the propagation of nerve impulse. Depending on the cell type considered, 7KC and 24S-OHC are able to modulate or not intracellular Ca²⁺ level (**Kölsch et al., 1999; Mackrill, 2011; Zarrouk et al., 2015d**), and in human retinal cells, 7KC-

1
2
3
4
5
6 induced toxicity has been reported to activate the P2X7 receptor which leads to Na⁺ and Ca²⁺
7
8 influx, and K⁺ efflux (Olivier et al., 2016). In mitochondria of wild-type and *Abcd1*^{-/-} mice, it
9
10 was also described that C24:0-induced cytotoxicity diminished the mitochondrial Ca²⁺ retention
11
12 capacity (Kruska et al., 2015). C24:0 has also been shown to increase intracellular Ca²⁺ levels in
13
14 glial cells and neurons from rat hippocampus culture (Hein et al., 2008). These different effects
15
16 suggest that C24:0-induced cytotoxicity could be due to its dramatic effects on mitochondrial
17
18 dysfunction and Ca²⁺ deregulation. However, nothing is known about the impact of C24:0 on K⁺
19
20 homeostasis. Additionally, in bone marrow derived-macrophages from *Abcd1*^{+/-} C57BL/6 mice,
21
22 glibenclamide (a K⁺ efflux inhibitor) was able to block inflammasome activation and IL-1β
23
24 secretion, which is thought to contribute to demyelination and brain degeneration in patients with
25
26 X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) (Jang et al., 2016). ATP-sensitive potassium (KATP)
27
28 channels localized in the plasma membrane and in the inner mitochondrial membrane have been
29
30 shown to play important roles in modulating neuronal excitability, cell survival, and cerebral
31
32 vascular tone. Interestingly, diazoxide, which is a KATP activator, can ameliorate molecular,
33
34 cytopathological, and behavioral alterations in 3xTg mice, which constitute a mouse model of
35
36 AD (Liu et al., 2010). As sustained-release fampridine, a slow release formulation of 4-
37
38 aminopyridine (4-AP), is used for the treatment of walking difficulties in MS, and is considered
39
40 efficient for the symptomatic management of this disease (Hadavi et al., 2014), it can be
41
42 supposed that better understanding of the regulation of K⁺ homeostasis in MS patients, and in
43
44 patients with AD, where a potential role of K⁺ is suspected (Plant et al., 2002), might lead to the
45
46 identification of new therapeutic targets and new treatments. It has thus been thought that
47
48 voltage-gated K⁺ (Kv) channels, mainly Kv3.1 designed for high-frequency repetitive firing and
49
50 expressed by different types of nerve cells in the CNS (Rudy and McBain, 2001; Joho and
51
52 Hurlock, 2009), could constitute new therapeutic targets (Leung, 2010). This hypothesis is
53
54
55
56
57
58
59
60

reinforced by the following observations: in the neocortex of aged APPPS1 mice (a transgenic model of Alzheimer's disease), Kv3.1 mRNA and protein levels were significantly lower compared to wild type, suggesting that a decrease in Kv3 currents could play a role in the cognitive symptoms of AD (**Boda et al., 2012**); 4-AP modulation of an A β (1-42)-induced I(K) (candidate channel Kv3.1) in human microglia could serve as a therapeutic strategy for neuroprotection in AD (**Franciosi et al., 2006**). At the molecular level, alternative splicing of the Kv3.1 gene gives rise to two isoforms that differ only in their COOH-terminal sequence, the last 18 amino acid sequences in Kv3.1a are replaced by 84 amino acid residues in Kv3.1b (**Luneau et al., 1991; Rudy et al. 1999; Weiser et al., 1994**). Interestingly, in the mature nervous system, the Kv3.1b splice variant of this channel predominates (**Song et al., 2006**).

As demyelinating and non-demyelinating neurodegenerative diseases involve microglial activation, which could have detrimental and beneficial effects depending on the stage of the diseases (**Tanaka and Yoshida, 2014**), it was of important to determine the impact of 7KC, 24S-OHC and C24:0 on BV-2 murine microglial cells. In addition, as a deterioration of the white matter does not seem specific to neurodegenerative demyelinating diseases, such as MS and peroxisomal leukodystrophies, and has been reported in patients with dementia (**Pini et al., 2016**), it was of interest to determine the impact of 7KC, 24S-OHC and C24:0 on oligodendrocytes, which are myelin synthesizing cells in the central nervous system (**Baumann and Pham-Dinh, 2001**). Indeed, there is now evidence that the breakdown of myelin is associated with AD. It is supposed that the vulnerability of oligodendrocytes in AD induces myelin breakdown and the loss of the myelin sheath, which might be the initiating step of the changes in the earliest stage of AD, prior to appearance of amyloid and tau pathology (**Cai and Xio, 2016**). To this end, 158N murine oligodendrocytes and BV-2 murine microglial cells were

1
2
3
4
5
6 cultured without or with 7KC, 24S-OHC and C24:0, and the effects of these lipids on Kv3.1b
7
8 expression, intracellular K⁺ levels, ROS overproduction, mitochondrial activity, and plasma
9
10 membrane integrity were determined.
11
12

13 14 15 **MATERIALS AND METHODS**

16 17 **Cells, cell cultures and treatments**

18
19 Murine oligodendrocytes (158N) were immortalized with the SV40 large T-antigen derived from
20
21 Tabby male (Ta/Y) control mice (Feutz et al., 2001); they show several characteristics of
22
23 differentiated oligodendrocytes (Baarine et al., 2009). 158N cells were plated at a density of 34
24
25 x 10³ cells / cm² in Dulbecco's modified Eagle medium with L-glutamine (Lonza, Levallois,
26
27 France) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Pan Biotech,
28
29 Aidenbach, Germany) and 1% antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin) (Pan
30
31 Biotech).
32
33

34
35 Murine microglial cells (BV-2) were from Banca-Biologica Cell Factory (IST Genoa, Italy).
36
37 They were seeded at a density of 17 x 10³ cells / cm² in RPMI 1640 (Lonza, Amboise, France)
38
39 supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Pan Biotech,
40
41 Aidenbach, Germany) and 1% antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin) (Pan
42
43 Biotech).
44
45

46
47 158N and BV-2 cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in tissue
48
49 culture dishes (100 × 20 mm, FALCON, Corning, Tewksbury, MA, USA) (with 10 mL of culture
50
51 medium), or per 12-well plate (with 1 mL of culture medium). After 24 h of culture, cells were
52
53 treated for 24 h with either oxysterols (7KC or 24S-OHC), or C24:0 used in a range of
54
55 concentrations from 2.5 to 25 μM, and from 1 to 20 μM, respectively. Initial solutions of 7-
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 ketocholesterol (7KC) (Ref: C2394, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and 24S-
7
8 hydroxycholesterol (24S-OHC) (provided by Prof. M. Samadi, Univ. Lorraine, Metz, France)
9
10 were prepared as previously described to obtain a final concentration of 2 mM (**Ragot et al.,**
11
12 **2013**). Briefly, to prepare the initial solution, 800 µg of oxysterols (7KC or 24S-OHC) were
13
14 dissolved in 50 µL of absolute ethanol (EtOH), used as vehicle, and 950 µL of culture medium
15
16 was added. Tetracosanoic acid (C24:0) (Sigma-Aldrich) was prepared at 400 µM in α -
17
18 cyclodextrin (vehicle) (Sigma-Aldrich). The maximal final concentration of absolute ethanol or
19
20 α -cyclodextrin in the culture medium was 0.05% and 1 µM, respectively (**Baarine et al., 2012;**
21
22 **Nury et al., 2015; Zarrouk et al., 2015 c-d**). The concentrations of 7KC, 24S-OHC and C24:0,
23
24 and the treatment times were based on data obtained in 158N cells treated with 7KC and 24S-
25
26 OHC, and 158N and SK-N-BE cells treated with C24:0 (**Baarine et al., 2012; Nury et al., 2015;**
27
28 **Zarrouk et al., 2015 a-c-d**). 4-aminopyridine (4-AP: 4 mM) (Sigma-Aldrich) was prepared as a
29
30 stock solution at 800 mM in culture medium.
31
32
33
34
35
36
37

38 **Measurement of transmembrane mitochondrial potential with DiOC₆(3)**

39
40 Variations in the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) were measured with the cationic
41
42 lipophilic dye 3,3'- dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC₆(3)) (Life Technologies / Thermo
43
44 Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Cells treated or not with 7KC, 24S-OHC (2.5 to 25 µM)
45
46 or C24:0 (1 to 20 µM) for 24 h were pooled, and stained for 10 min at 37°C with DiOC₆(3) used
47
48 at 40 nM; mitochondrial depolarization (loss of $\Delta\Psi_m$) is indicated by a decrease in green
49
50 fluorescence measured by flow cytometry. Green fluorescence was collected through a 520 ± 10
51
52 nm bandpass filter on a Galaxy flow cytometer (Partec, Münster, Germany). A total of 10,000
53
54 cells were analyzed for each sample, and the fluorescent signals were measured on a logarithmic
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 scale. Data were analyzed with Flomax (Partec) or FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA)
7
8 software.
9

10 11 12 **Measurement of reactive oxygen species production with dihydroethidium**

13
14
15 Overproduction of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) were detected with dihydroethidium (DHE; Life
16
17 Technologies) (Rothe et al., 1990). DHE, a non-fluorescent compound, diffuses through cell
18
19 membranes and is rapidly oxidized in ethidium under the action of reactive oxygen species,
20
21 mainly $O_2^{\bullet-}$ (Rothe et al., 1990). Control (untreated cells), 7KC, 24S-OHC (2.5 to 25 μ M) or
22
23 C24:0 (1 to 20 μ M) -treated cells were pooled and stained with DHE (2 μ M). After 15 min at
24
25 37°C, the fluorescent signals of DHE-stained cells were collected through a 520/20 nm bandpass
26
27 filter. Fluorescent signals were measured on a logarithmic scale on a GALAXY flow cytometer
28
29 (Partec); 10,000 cells were acquired; data were analyzed with Flomax (Partec) or FlowJo (Tree
30
31 Star Inc.) software. Three independent experiments carried out in triplicate were performed.
32
33
34
35
36
37
38

39 **Quantification of cell death by staining with propidium iodide**

40
41 Control (untreated cells), 7KC, 24S-OHC (2.5 to 25 μ M) or C24:0 (1 to 20 μ M) -treated cells
42
43 were pooled and stained for 10 min with propidium iodide (PI: 1 μ g/mL), a fluorescent
44
45 compound which enters dead cells or cells with damaged cytoplasmic membranes (Lizard et al.,
46
47 1995). Membrane permeability was analyzed with a Galaxy flow cytometer (Partec) equipped
48
49 with a 488-nm blue laser. Red fluorescence of PI was collected on a logarithmic scale of
50
51 fluorescence using a 590 ± 10 nm bandpass filter and analyzed with Flomax (Partec) or FlowJo
52
53 (Tree Star Inc.) software.
54
55
56
57
58
59
60

Measurement of intracellular potassium by flame photometry

Intracellular potassium $[K^+]_i$ was measured using a Flame Photometer (Biocode Hycel PHF 108, Biocode Hycel, Liège, Belgium) with a propane flame; lithium was used as an internal standard. After 24 h of culture, cells were treated for 24 h with either oxysterols (7KC, 24S-OHC (2.5 to 25 Mm)) or C24:0 (1 to 20 μ M). Cells were washed with HBSS (pH=7.4), resuspended in 1 mL of deionized water and lysed by repeated cycles of freezing and thawing. They were then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatant was analyzed.

Identification and quantification of Kv3.1 by flow cytometry and fluorescence microscopy

Identification and quantification of Kv3.1 were performed on cell suspensions and deposits by flow cytometry and fluorescence microscopy, respectively. Cells were collected, washed in PBS, 1% BSA, 0.1% NaN_3 , resuspended in PBS, and fixed in freshly prepared 2% (w/v) p-formaldehyde diluted in PBS (pH 7.4) (10 min; room temperature). Cells were permeabilized with (PBS, 0.05% saponin (Sigma-Aldrich), 10% FBS (Pan Biotech)) for 20 min. After two washes in PBS, cells were incubated (1 h; 4°C) with the primary antibody directed against Kv3.1 diluted at 1:100 in the permeabilizing buffer (rabbit polyclonal (Abcam, Cambridge, UK); ref: ab101693, mouse monoclonal (Santa-Cruz Biotechnology, Santa-Cruz, CA, USA); ref: sc-514554; mouse monoclonal (Sigma-Aldrich); ref: SAB5200030 (anti-kv3.1b)). Cells were then washed twice with PBS and incubated (1 h; room temperature) with a 488-Alexa goat anti-rabbit (Abcam) or a goat anti-mouse (Invitrogen / Thermo Fisher Scientific) used at 1/500. A conjugated control (without primary antibody) was performed. Cells were washed and resuspended in PBS, and analyzed by flow cytometry on a Galaxy flow cytometer (Partec). The green fluorescence of 488-Alexa was collected with a 520/10 nm bandpass filter. For each sample, 10,000 cells were acquired, and the data were analyzed with Flomax (Partec) or FlowJo

(FlowJo Inc.) software. For fluorescence microscopy analyses, nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Sigma–Aldrich) used at a concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After washing with PBS, cell deposits were obtained by cytocentrifugation with a cytospin 4 centrifuge (Shandon, Cheshire, UK). Slides were mounted and observed with an Axioskop Zeiss microscope, and digitalized images were obtained with an AxioCam Zeiss camera (Zeiss, Jena, Germany).

Polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting

Cells washed in PBS were lysed in 100 μL of cold radio-immunoprecipitation assay buffer (RIPA) (10 mM Tris–HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet NP40, 0.5% Na deoxycholate, 0.1% SDS, 2 mM EDTA and 50 mM NaF) containing 1:25 protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics Corporation, Meylan, France). After incubation on ice for 30 min, samples were centrifuged at 14,000 \times g in an Eppendorf microcentrifuge for 15 min at 4°C, and the supernatant was recovered. The protein concentration was measured in the supernatant using the Bicinchoninic Acid Assay (Sigma-Aldrich). Seventy micrograms of protein were resolved in gel loading buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4.6% SDS, 20% glycerol, 0.003% bromophenol blue) and separated on a 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel then subsequently transferred onto nitrocellulose membranes (Thermo Fisher Scientific). After blocking for 1 h with 5% BSA in PBST (0.1% Tween 20) (Sigma-Aldrich), membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibody raised against Kv3.1b (1:500 (mouse monoclonal; ref: SAB5200030; Sigma-Aldrich)) diluted with PBST, 1% BSA. Antibody directed against β -actin (1:5000 (mouse monoclonal antibody; ref: A2228; Sigma-Aldrich)) was used to detect reference protein expression. The membrane was then washed twice with PBST and incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) diluted at 1:5,000. Immunopositive bands were

1
2
3
4
5
6 visualized by the enhanced chemiluminescence kit (Super Signal West Femto Maximum
7 Sensitivity Substrate, Thermo Fisher Scientific) and Chemidoc XRS⁺ (Santa Cruz
8 Biotechnology). Semi-quantification of Kv3.1b luminescence signal intensity versus actin was
9 determined by computer-assisted analyses of optical density using Image Lab 4.0.1 software
10 (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France).
11
12
13
14
15
16

17 18 19 20 **Statistical analysis**

21
22 Statistical analyses were carried out with GraphPad Prism 6.07 software. Data were expressed as
23 mean \pm SEM and statistical analyses were performed by two-way ANOVA (Tukey's test). The
24 Pearson's correlation test was used to evaluate the relationships between various parameters. *P*
25 values < 0.05 were considered statistically significant.
26
27
28
29
30
31
32
33

34 **RESULTS**

35 36 37 **Evaluation of the expression of Kv3.1 protein in 158N murine oligodendrocytes and BV-2** 38 **murine microglial cells**

39
40 The presence of Kv3.1 protein (Kv3.1a and/or Kv3.1b) in 158N and BV-2 cells was detected by
41 flow cytometry (**Figure 1A**) and immunofluorescence microscopy (**Figure 1B**). The levels of
42 Kv3.1 protein were studied using either a mouse monoclonal antibody raised against amino acids
43 118-179 (Santa Cruz antibody recognizing Kv3.1a and Kv3.1b), a rabbit polyclonal antibody
44 (Abcam from unknown specificity regarding the a and b subtype of Kv3.1), and a mouse
45 monoclonal antibody raised against a peptide corresponding to the C terminus (437-585) (Sigma-
46 Aldrich antibody recognizing Kv3.1b). With all antibodies used, strong expression of Kv3.1 was
47 observed in both 158N and BV-2 cells: the percentage of Kv3.1 positive cells ranged from 90 to
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 98%, and the mean fluorescence intensity (MFI) was always stronger than that in conjugated
7
8 controls (**Figure 1A**). This high expression of kv3.1 was confirmed by fluorescence microscopy
9
10 (**Figure 1B**). Altogether, our data indicate that Kv3.1 is strongly expressed by 158N and BV-2
11
12 cells. Further analyses were conducted by western blotting in order to determine the specificity of
13
14 the antibodies used. In our hands, the Santa-Cruz antibody was not suitable to perform western
15
16 blot analyses. As the specificity of the Abcam antibody was not provided by the manufacturer,
17
18 immunoblot analysis was not done. It is noteworthy that immunoblot analysis of total protein
19
20 extracts performed with the Sigma-Aldrich antibody revealed a single band at around 66 kDa
21
22 corresponding to the core Kv3.1b (**Ozaita et al., 2002**) (**Figure 1C**). For further analyses, the
23
24 Sigma-Aldrich antibody was used to characterize the effects of 7KC, 24S-OHC and C24:0 on
25
26 Kv3.1b expression.
27
28
29
30
31
32
33
34

35 **Effect of 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid (C24:0) on** 36 37 **Kv3.1b channel expression in 158N and BV-2 cells**

38
39
40 Flow cytometric analyses associated or not with western blotting were performed to investigate
41
42 the effects of 7KC, 24S-OHC and C24:0 on Kv3.1b expression in 158N and BV-2 cells. To this
43
44 end, 158N cells were cultured for 24 h without (control), or with 7KC (2.5 to 25 μ M), 24S-OHC
45
46 (2.5 to 25 μ M) and C24:0 (1 to 20 μ M), or with the different vehicle (EtOH (0.005 to 0.05%); α -
47
48 cyclodextrin (0.05 to 1 mM)). The expression of Kv3.1b was simultaneously analyzed by flow
49
50 cytometry and western blotting. Under treatment with 7KC and 24S-OHC, flow cytometric
51
52 analyses showed an increase in Kv3.1b expression at 12.5 and 25 μ M as compared with the
53
54 corresponding EtOH-treated cells (**Figure 2A**). No significant difference was observed between
55
56 untreated cells (control) and EtOH-treated cells at 0.005% and 0.025% (**Figure 2A**). These data
57
58
59
60

are in agreement with those obtained by western blot analysis, which also revealed a significant increase in Kv3.1b under treatment with 7KC (2.5 μ M) (**Figure 2B**). With C24:0, used in a range of concentration from 1 to 20 μ M, no modification of Kv3.1b expression was found by either flow cytometry or western blot analysis; no difference was observed between control and α -cyclodextrin-treated cells (**Figure 2A-B**).

In BV-2 cells, by flow cytometry, no significant modulation of Kv3.1b expression was revealed after 24 h of treatment with oxysterols (7KC or 24S-OHC: 2.5 to 25 μ M) or C24:0 (1 to 20 μ M) (**Figure 3A**). Prolonged exposure (48 h) was required to induce significant overexpression of Kv3.1b with 7KC and 24S-OHC (25 μ M) and with C24:0 (10 μ M) (**Figure 3B**).

Effects of 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid (C24:0) on the intracellular K⁺ level

The impact of 7KC (2.5 to 25 μ M), 24S-OHC (2.5 to 25 μ M) and C24:0 (1 to 20 μ M) on [K⁺]_i was determined in 158N and BV-2 cells by flame photometry (**Figure 4**). 4-AP (4 mM), a universal Kv channel blocker, was used as a positive control to favor K⁺ accumulation.

In 158N cells, marked effects of 7KC and 24S-OHC were detected on [K⁺]_i. Significant increases in [K⁺]_i were induced by 7KC and 24S-OHC from 2.5 to 25 μ M as compared with the corresponding vehicle (EtOH) concentration (**Figure 4 A**). Lower K⁺ accumulation was observed with C24:0, even though significant increases were detected from 5 to 20 μ M (**Figure 4 A**). With the vehicles, as compared with untreated cells, slight effects were detected with EtOH at 0.05% only (**Figure 4 A**).

The result obtained for BV-2 cells, after 24 h with either 7KC, 24S-OHC or C24:0 showed a slight effect on [K⁺]_i (**Figure 4 B**). After 48 h of treatment with 7KC or 24S-OHC, as compared with the corresponding vehicle (EtOH), no significant differences were observed (**Figure 4C**).

1
2
3
4
5
6 After 48 h of treatment with C24:0, a slight but significant increase was observed at 20 μM only
7
8 **(Figure 4 C)**. No difference was observed between control and vehicle (EtOH or α -cyclodextrin)
9
10 **(Figure 4 B-C)**.

11 12 13 14 15 **Evaluation of the correlation between Kv3.1b expression and intracellular potassium** 16 17 **concentration**

18
19
20 The correlation between Kv3.1b expression and $[\text{K}^+]_i$ was mainly observed in 158N cells treated
21
22 with 7KC for 24 h ($r = 0.83$; $p < 0.0001$) and in BV-2 cells treated for 24 h ($r = 0.65$; $p = 0.056$)
23
24 and 48 h ($r = 0.68$; $p < 0.013$) **(Figure 5)**. With 24S-OHC a significant correlation was observed
25
26 in 158N only ($r = 0.74$; $p = 0.0009$) **(Figure 5)**. No correlation was observed under treatment
27
28 with C24:0 **(Figure 5)**
29
30

31 32 33 34 **Evaluation of the correlation between Kv3.1b expression, intracellular potassium, and cell** 35 36 **damages**

37
38 The correlation between Kv3.1b expression, $[\text{K}^+]_i$ and cell damages induction was studied by
39
40 taking into account the percentage of DiOC₆(3)-negative cells, and DHE- and PI-positive cells
41
42 **(Tables 1-2)**. The percentage of DiOC₆(3)-negative cells (cells with depolarized mitochondria),
43
44 of DHE-positive cells (cells which overproduce $\text{O}_2^{\bullet-}$) and PI-positive cells (cells with damaged
45
46 plasma membrane and/or dead cells) among 158N cells treated for 24 h with 7KC (2.5 to 25 μM),
47
48 24S-OHC (2.5 to 25 μM), and C24:0 (1 to 20 μM) are shown in **Supplementary Table 1**. The
49
50 percentage of DiOC₆(3)-negative cells, and of DHE- and PI-positive cells among BV-2 cells
51
52 treated with 7KC (2.5 to 25 μM), 24S-OHC (2.5 to 25 μM), and C24:0 (1 to 20 μM) for 24 and
53
54
55
56
57 48 h are shown in **Supplementary Tables 2 and 3**, respectively.
58
59
60

1
2
3
4
5
6 In agreement with previous report (Baarine et al., 2012; Nury et al., 2015), 158N cells treated
7 with 7KC, 24S-OHC, and C24:0 for 24 h, showed a loss of transmembrane mitochondrial
8 potential ($\Delta\Psi_m$), revealed by an increase in the percentage of DiOC₆(3)-negative cells
9 (Supplementary Table 1). This was associated with the overproduction of O₂^{•-}, revealed by
10 increased percentages of DHE-positive cells, and with damaged plasma membranes and/or cell
11 death induction, indicated by increased percentages of PI-positive cells (Supplementary Table
12 1).

13
14
15
16
17
18
19
20
21
22 BV-2 cells treated with 7KC, 24S-OHC, and C24:0 for 24 h showed slight cytotoxic effects:
23 slight increases in DiOC₆(3)-negative cells, DHE-positive cells, and PI-positive cells were
24 observed (Supplementary Table 2). At 48 h, marked effects of 7KC were mainly found
25 (Supplementary Table 3).

26
27
28
29
30
31
32 In 158N cells (24 h), the analysis of the correlation between the Kv3.1b level (MFI measured by
33 flow cytometry) and DiOC₆(3)-negative cells, DHE- and PI-positive cells, showed a marked
34 positive correlation in cells treated with 7KC and 24S-OHC, and no significant correlation with
35 C24:0-treated cells (Table 1; supplementary Figure 1). A significant positive correlation was
36 observed between the Kv3.1b level and DiOC₆(3)-negative cells for BV-2 cells treated for 24
37 hours with 7KC and C24:0, and between the Kv3.1b level and DiOC₆(3)-negative cells, DHE-
38 positive cells, and PI-positive in BV-2 cells treated with 24S-OHC (Table 1; supplementary
39 Figure 2). A significant positive correlation was also observed between the Kv3.1b level and
40 DiOC₆(3)-negative cells, DHE-positive cells, and PI-positive cells in BV-2 cells treated with
41 7KC and 24S-OHC for 48 h whereas no correlations were found with C24:0 (Table 1;
42 supplementary Figure 3).

43
44
45
46
47
48 For 158N and BV-2 cells (24 h), the analysis of the correlation between [K⁺]_i (measured by flame
49 photometry) and DiOC₆(3)-negative cells, DHE- and PI-positive cells showed significant positive
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 correlations (**Table 2, supplementary Figure 4-5**). In BV-2 cells (48 h), 7KC and C24:0 were
7
8 associated with significant positive correlations between $[K^+]_i$, DiOC₆(3)-negative cells, DHE-
9
10 and PI-positive cells; no correlations were found with 24S-OHC (**Table 2, supplementary**
11
12 **Figure 6**).

13 14 15 16 17 18 **DISCUSSION**

19
20 Increased levels of 7KC, 24S-OHC and/or C24:0 have been reported in major neurodegenerative
21
22 diseases: AD (**Björkhem, 2006; Hascalovici et al., 2009; Leoni et al., 2013; Zarrouk et al.,**
23
24 **2014; Testa et al., 2016**), MS (**Leoni et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2016; Crick et al.,**
25
26 **2016; Zhornitsky et al., 2016**), Parkinson's disease (**Doria et al., 2016**), X-ALD (**Nury et al.,**
27
28 **2016**), Huntington's disease (**Kreilaus et al., 2016; Petrov et al., 2016**), and Niemann-Pick
29
30 disease (**Porter et al., 2010; Boenzi et al., 2016; Romanello et al., 2016**). It is therefore
31
32 suspected that 7KC, 24S-OHC and C24:0, which are known to induce important cell dysfunctions
33
34 including oxidative stress on nerve cells in vitro (**Baarine et al., 2012; Nury et al., 2015**), could
35
36 contribute to favor neurodegeneration. As it has been reported that modulation of K^+ channel
37
38 activities by oxidative stress can constitute a significant determinant in aging and
39
40 neurodegenerative diseases (**Wei et al., 2017; Sesti, 2016; Cai and Sesti, 2009; Cotella et al.,**
41
42 **2012; Wu et al., 2013**), and as modifications of $[K^+]_i$ can contribute to inflammation (**Yaron et**
43
44 **al., 2015**) and to cell death induction (**Kunzelmann, 2016**), which are hallmark of brain
45
46 degeneration, the impact of 7KC, 24S-OHC and C24:0 was simultaneously studied on Kv3.1b
47
48 channel expression and $[K^+]_i$ on oligodendrocytes and microglial cells involved in demyelinating
49
50 and non demyelinating neurodegenerative diseases (**Ukpong et al., 2014; Eittle et al., 2016**). On
51
52 158N murine oligodendrocytes and on murine microglial BV-2 cells, our data establish that the
53
54
55
56
57
58
59
60

lipotoxicity of 7KC, 24S-OHC and C24:0 is associated with more or less pronounced modulations of Kv3.1b expression and $[K^+]_i$ accumulation.

In the present study, we described for the first time, the presence of Kv3.1b protein in both 158N and BV-2 cells. It is known that Kv3.1b channel expression is widespread in the nervous system; in adult brain, Kv3.1b mRNA is far more abundant than the Kv3.1a transcript, with both transcripts strongly expressed in neuronal subpopulations of the olfactory bulb, neocortex, hippocampus, basal nuclei, thalamus, brainstem, and cerebellum (Perney et al., 1992; Weiser et al., 1994). Our attention focused on Kv3.1b channel because it was identified that Kv3.1 is expressed in significant quantities in oligodendrocyte cells and plays important role in their structure and function (Tiwari-Woodruff et al., 2006). Notably, a reduction in myelin thickness and a decrease in the number of large-diameter axons was observed in *Kv3.1*-knockout (*Kv3.1*^{-/-}) mice (Tiwari-Woodruff et al., 2006). On microglia cells, it was reported that Kv3.1 channels is up-regulated in microglia activation and could regulate the production of pro-inflammatory signaling molecules such as IL-1 β , IL-6, TNF α and nitric oxide (Franciosi et al., 2006; Wu et al., 2009). A rapid modulation of the expression of Kv3.1 channel has also been detected in A β_{1-42} -treated microglia (Franciosi et al., 2006).

Our study also shows that 7KC, 24S-OHC and C24:0 induce ROS overproduction and cell damages (loss of transmembrane mitochondrial potential, increased permeability of plasma membrane) on 158N murine oligodendrocytes and BV-2 microglial cells. However, the possible interaction of these compounds with Kv channels remained obscure, especially the impact of voltage-gated K⁺ (Kv) on cell damages. The present data underline that the most important up-regulation of Kv3.1b occur on 158N cells under treatment with 7KC and 24S-OHC, and are less important mainly on BV-2 cells treated with 7KC. We found an dose-dependent increased level of Kv3.1b expression along with increasing percentage of damaged cells revealed by higher

percentages of DiOC₆(3) negative cells (cells with depolarized mitochondria), DHE positive cells (cells overproducing O₂^{•-}) and PI positive cells (cells with damaged plasma membrane and/or dead cells), indicating that Kv3.1b is associated to cell damages involved in cell death induction. These data underline that the modulation of expression of Kv3.1b depends on the type of nerve considered. To better explore this results, a Pearson correlation test was performed to analyze whether the upregulation of Kv3.1b expression was associated or not with marked and characteristic cytotoxic effects of 7KC, 24S-OHC and C24:0. Notably, on 158N cells, there was a marked correlation between Kv3.1b and the mitochondrial depolarization, O₂^{•-} overproduction and plasma membrane damages under treatment with 7KC and 24S-OHC; with C24:0, in the absence of modulation of Kv3.1 expression, no significant correlations have been shown. In BV-2 cells after 24 h, whatever the compound considered no significant modulation of Kv3.1b expression was detected. However, with 24S-OHC, a significant positive correlation was observed between Kv3.1b expression and the different parameters analyzed (percentage of DiOC₆(3) negative cells, DHE positive cells, and PI positive cells); with 7KC and C24:0 a positive correlation was only found between Kv3.1b expression and the percentage of DiOC₆(3) negative cells. On BV-2 cells, after 48 h, mitochondrial depolarization, O₂^{•-} overproduction and cell death are strongly correlated with Kv3.1b expression in presence of 7KC and 24S-OHC. Altogether, these findings may provide evidence for a mechanistic link between Kv3.1b expression, mitochondrial depolarization and oxidative stress in 158N oligodendrocyte in the presence of 7KC and 24S-OHC, and in BV-2 microglial cells in presence of oxysterols (7KC and 24S-OHC) and C24:0.

The idea that K⁺ channels play an important role in the ionic regulation of cell death has already been reported (Yu, 2003; Bortner and Cidlowski, 2007). It has been described that modulation of K⁺ channel activities by oxidative stress has emerged as a significant determinant in aging and

neurodegeneration (Sesti, 2016; Wei et al., 2017). It has also been reported that $O_2^{\bullet-}$ overproduction can reduce Kv channel activity (Cai et al., 2009; Cotella et al., 2012; Wu et al., 2013). In addition, it was documented that oxysterols, depending on the nature and location of the oxygen substitution, have distinct impacts on the biophysical properties of membranes, including the formation of liquid ordered domains (Olkonen and Hynynen, 2009). This supports the notion that the effects of oxysterols on the biophysical properties of the plasma membrane could explain, at least in part, some of their biological activities on Kv3.1b. It was reported that at least 14 species of K^+ channels are involved in apoptosis of various cells (Yu, 2003). An increase in the integral permeability of K^+ channels is conventionally associated with the opening of channels leading to hyperpolarization of apoptotic cells, whereas depolarization was mostly observed (Bortner et al., 2001; Franco et al., 2006; Bortner and Cidlowski, 2007). Perturbation of cellular K^+ homeostasis could be a common motif in apoptosis; increase of intracellular K^+ level, induced by valinomycin, have also been associated with autophagy in BV-2 cells (Klein et al., 2011). Studies, which describe the mode of valinomycin-induced cell death, report cell shrinkage (Inai et al., 1997; Yu et al., 1997), chromatin condensation (Yu et al., 1997), fragmentation of the nucleus (Deckers et al., 1993), pyknotic nuclei (Inai et al., 1997), internucleosomal DNA fragmentation in several nerve cell lines (BV-2, C6 rat glioma cells) and in primary mouse astrocytes and microglia cells. Currently, the cytotoxic effects of 7KC and 24S-OHC are associated with oxiaoptophagy (OXIdation, APOPTOsis, and autoPHAGY) in 158N and BV-2 cells (Nury et al., 2014; Nury et al., 2015). Depending on the cell line, oxiaoptophagy is associated or not with modulation of Ca^{2+} homeostasia (Vejux and Lizard, 2009; Zarrouk et al., 2015 d). However, the impact of 7KC, 24S-OHC and C24:0 on the intracellular K^+ homeostasis is unknown. Our data establish that these compounds increased $[K^+]_i$ in a dose-dependent manner in 158N and BV-2 cells. The highest intracellular K^+ levels were

1
2
3
4
5
6 detected on 158N cells in presence of 7KC, 24S-OHC and C24:0 cells and is positively correlated
7
8 with mitochondrial depolarization, excessive production of O_2^{\bullet} and increased plasma membrane
9
10 permeability which are associated with lipotoxicity. This lead us to speculate that K^+ retention
11
12 could contribute to 7KC-, 24S-OHC- and C24:0-induced cytotoxic effects.

13
14
15 Noteworthy, significant positive correlation between $[K^+]_i$ and Kv3.1b expression have been also
16
17 observed suggesting that regulation of K^+ homeostasis in oligodendrocytes and microglial cells
18
19 could involve Kv3.1b. However, the contribution of other K^+ channel cannot be excluded.
20
21 Indeed, on 7KC and 25-hydroxycholesterol-treated keratinocytes and retinal cells, an activation
22
23 of the non-selective P2X7 purinoreceptor leading to Na^+ and Ca^{2+} influx, as well as K^+ efflux was
24
25 described (**Olivier et al., 2016**). In addition, in human endothelial cells, 7KC used at non-toxic
26
27 concentrations also inhibits Na, K-ATPase activity by decreasing expression of its $\alpha 1$ -subunit
28
29 (**Duran et al., 2010**). It has also been reported that 24S-OHC modulates NMDAR-mediated
30
31 function in hippocampal slices (**Sun et al., 2016**). NMDARs are glutamate-gated ion channels
32
33 which regulate the influx of Na^+ and Ca^{2+} with the efflux of K^+ from the cells, and which play
34
35 critical roles in governing brain function and cognition. Moreover, a constitutive expression of a
36
37 series of outwardly rectifying K channels, Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5, Kv1.6, and Kv2.1, are
38
39 expressed in resting human microglia (**Wu et al., 2009**) and could be affected in BV-2 cells.
40
41
42
43
44

45
46 Consequently, it can be supposed that the regulation of Kv3.1b activity and/or expression could
47
48 suppress intracellular K^+ retention and associated side effects and thus constitute a new
49
50 pharmacological target to prevent neurodegeneration.
51
52

53
54 These findings provide compelling evidences that modulation of Kv3.1b expression and
55
56 intracellular K^+ level are critically linked to various cytotoxic effects triggered by oxysterols and
57
58 C24:0 including oxidative stress, mitochondrial dysfunctions and plasma membrane damages on
59
60

1
2
3
4
5
6 158N oligodendrocytes and BV-2 microglial cells. This may provide a mechanistic link to better
7
8 understand the relationships between Kv3.1b expression, K⁺ homeostasis, oxidative stress,
9
10 mitochondrial activity, and plasma membrane damages in oligodendrocyte and microglial cells
11
12 which are affected in numerous neurodegenerative diseases. These data also support the notion
13
14 that the lipid environment could affect K⁺ channel functionality, and they suggest that increased
15
16 levels of 7KC, 24S-OHC, and C24:0, which are often found in the body fluids and brain of
17
18 patients with neurodegenerative disease, could impact nerve impulses and nerve cell functions.
19
20 Consequently, it can be supposed that the regulation of Kv3.1b activity and/or expression,
21
22 involved in the control of K⁺ homeostasis, could constitute a new pharmacological target to
23
24 prevent neurodegeneration.
25
26
27
28
29
30

31 **CONFLICT OF INTEREST**

32
33 The authors have no conflicts of interest to declare.
34
35

36 **ACKNOWLEDGEMENTS**

37
38 This work was supported by grants from: Univ. Bourgogne (Dijon, France), Univ. El Manar
39
40 (Tunis, Tunisia), ASSAD (Louhans, France) and the Departments of Neurology (Prof. Thibault
41
42 Moreau, University Hospital, Dijon, France; Prof. Jérôme de Sèze, University Hospital,
43
44 Strasbourg, France). We wish to thank Dr. Afef Bahlous, for his help with flame photometry
45
46 experimental setting. The technical support of Ms. Nejla Labben is gratefully acknowledged. We
47
48 also thank Mr Philip Bastable for English corrections.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

Astarita G, Jung KM, Vasilevko V, Dipatrizio NV, Martin SK, Cribbs DH, Head E, Cotman CW, Piomelli D. 2011. Elevated stearyl-CoA desaturase in brains of patients with Alzheimer's disease. *PLoS One* 6(10).

Baarine M, Andréoletti P, Athias A, Nury T, Zarrouk A, Ragot K, Vejux A, Riedinger JM, Kattan Z, Bessede G, Trompier D, Savary S, Cherkaoui-Malki M, Lizard G. 2012. Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid-treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins. *Neuroscience*. 213: 1–18.

Baarine M, Ragot K, Genin EC, El Hajj H, Trompier D, Andreoletti P, Ghandour, M.S., Menetrier F, Cherkaoui-Malki M, Savary S, Lizard G. 2009. Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytic cell lines (158N, 158JP): potential models for the study of peroxisomal disorders associated with dysmyelination processes. *Neurochem* 111: 119–131.

Baumann N, Pham-Dinh D. 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81: 871-927.

Björkhem I, Meaney S. 2004. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 806-815.

1
2
3
4
5
6 Björkhem I. 2006. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic
7 modulators in the brain. *Intern Med* 260: 493-508.
8
9

10
11 Boda E, Hoxha E, Pini A, Montarolo F, Tempia F. 2012. Brain expression of Kv3 subunits
12 during development, adulthood and aging and in a murine model of Alzheimer's disease. *J Mol*
13
14
15
16 *Neurosci* 46: 606-615.
17

18
19
20 Boenzi S, Deodato F, Taurisano R, Goffredo BM, Rizzo C, Dionisi-Vici C. 2016. Evaluation of
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
plasma cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol and 7-ketocholesterol in inherited disorders related to
cholesterol metabolism. *Lipid Res* 57: 361-367.

Bortner C, Cidlowski J. 2007. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role, in apoptosis.
Arch Biochem Biophys 462: 176-188.

Bortner C, Gómez-Angelats M, Cidlowski JA. 2001. Plasma membrane depolarization without
re-polarization is an early molecular event in anti-Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 276: 4304-
4314.

Braverman N, Moser A. 2012. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim*
Biophys Acta 1822: 1442-1452.

Brites P, Waterham HR, Wanders RJ. 2004. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health
and disease. *Biochim Biophys Acta* 22: 219-231.

1
2
3
4
5
6 Cai SQ, Sesti F. 2009. Oxidation of a potassium channel causes progressive sensory function loss
7 during aging. *Nat Neurosci* 12: 611-617.
8
9

10
11
12
13 Cai Z, Xiao M. 2016. Oligodendrocytes and Alzheimer's disease. *Int J Neurosci* 126: 97-104.
14
15

16
17
18 Corder E, Saunders A, Strittmatter W, Schmechel D, Gaskell P, Small G, Roses A, Haines J,
19 Pericak-Vance M. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's
20 disease in late onset families. *Science* 261: 921-923.
21
22
23

24
25
26
27 Cotella D, Hernandez-Enriquez B, Wu X, Li R, Pan Z, Leveille J, Link CD, Oddo S, Sesti F.
28
29 2012. Toxic role of K⁺ channel oxidation in mammalian brain. *J Neurosci* 32: 4133-4144.
30
31

32
33
34 Crick PJ, Griffiths WJ, Zhang J, Beibel M, Abdel-Khalik J, Kuhle J, Sailer AW, Wang Y. 2016.
35 Reduced Plasma Levels of 25-Hydroxycholesterol and Increased Cerebrospinal Fluid Levels of
36 Bile Acid Precursors in Multiple Sclerosis Patients. *Mol Neurobiol*. (Epub ahead of print)
37
38
39

40
41
42
43 Deckers CL, Lyons AB, Samuel K, Sanderson A, Maddy AH. 1993. Alternative pathways of
44 apoptosis induced by methylprednisolone and valinomycin analyzed by flow cytometry. *Exp Cell*
45
46
47
48 Res 208: 362–370.
49

50
51
52 Doria M, Maugest L, Moreau T, Lizard G, Vejux A. 2016. Contribution of cholesterol and
53 oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med* 101: 393–400.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 Duran MJ, Pierre SV, Lesnik P, Pieroni G, Bourdeaux M, Dignat-Georges F, Sampol J, Maixent
7 JM. 2010. 7-ketocholesterol inhibits Na,K-ATPase activity by decreasing expression of its α 1-
8 subunit and membrane fluidity in human endothelial cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 56
9 Suppl: OL1434-441.
10
11
12
13
14
15

16
17 Etle B, Schlachetzki JC, Winkler J. 2016. Oligodendroglia and Myelin in Neurodegenerative
18 Diseases: More Than Just Bystanders? *Mol Neurobiol* 53: 3046-3062.
19
20
21
22

23
24 Feutz AC, Pham-Dinh D, Allinquant B, Mieke M, Ghandour MS. 2001. An immortalized jimpy
25 oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway. *Glia* 34: 241–252.
26
27
28
29

30
31 Franciosi S, Ryu JK, Choi HB, Radov L, Kim SU, McLarnon JG. 2006. Broad-spectrum effects
32 of 4-aminopyridine to modulate amyloid beta1-42-induced cell signaling and functional
33 responses in human microglia. *J Neurosci* 26: 11652-11664.
34
35
36
37
38

39
40 Franco R, Bortner CD, Cidlowski JA. 2006. Potential roles of electrogenic ion transport and
41 plasma membrane depolarization in apoptosis. *J Membr Biol* 209: 43-58.
42
43
44
45

46
47 Gamba P, Testa G, Gargiulo S, Staurengi E, Poli G, Leonarduzzi G. 2015. Oxidized cholesterol
48 as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 7: 119.
49
50
51
52

53
54 Hadavi S, Baker, MD, Dobson R. 2017. Sustained-release fampridine in multiple sclerosis. *Mult*
55 *Scler Relat Disord* 3: 17-21.
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 Hascalovici JR, Vaya J, Khatib S, Holcroft CA, Zukor H, Song W, Arvanitakis Z, Bennett DA,
7 Schipper HM. 2009. Brain sterol dysregulation in sporadic AD and MCI: relationship to heme
8 oxygenase-1. *Neurochem* 110: 1241-1253.
9

10
11
12
13 Hein S, Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G. 2008. Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-
14 associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture.
15
16
17 *Hum. Mol. Genet.* 17: 1750–1761.
18

19
20
21
22 Inai Y, Yabuki M, Kanno T, Akiyama J, Yasuda T, Utsumi K. 1997. Valinomycin induces
23 apoptosis of ascites hepatoma cells (AH-130) in relation to mitochondrial membrane potential.
24
25
26 *Cell Struct Funct* 22: 555–563.
27

28
29
30
31 Jang J, Park S, Jin Hur H, Cho HJ, Hwang I, Pyo Kang Y, Im I, Lee H, Lee E, Yang W, Kang
32 HC, Won Kwon S, Yu JW, Kim DW. 2016. 25-hydroxycholesterol contributes to cerebral
33 inflammation of X-linked adrenoleukodystrophy through activation of the NLRP3
34 inflammasome. *Nat Commun* 7: 13129.
35
36
37

38
39
40
41
42
43 Jeitner TM, Voloshyna I, Reiss AB. 2011. Oxysterol derivatives of cholesterol in
44 neurodegenerative disorders. *Curr Med Chem* 18: 1515-1525.
45
46
47

48
49
50 Joho RH, Hurlock EC. 2009. The role of Kv3-type potassium channels in cerebellar physiology
51 and behavior. *Cerebellum* 8: 323-333.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 Klein B, Wörndl K, Lütz-Meindl U, Kerschbaum HH. 2011. Perturbation of intracellular K(+) homeostasis with valinomycin promotes cell death by mitochondrial swelling and autophagic processes. *Apoptosis* 16: 1101-1117.

12
13
14
15 Kölsch H, Lütjohann D, Tulke A, Björkhem I, Rao ML. 1999. The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res* 818: 171-175.

18
19
20
21
22 Kou J, Kovacs GG, Höftberger R, Kulik W, Brodde A, Forss-Petter S, Hönigschnabl S, Gleiss A, Brügger B, Wanders R, Just W, Budka H, Jungwirth S, Fischer P, Berger J. 2011. Peroxisomal alterations in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 122: 271-283.

26
27
28
29
30
31 Kreilau F, Spiro AS, McLean CA, Garner B, Jenner AM. 2016. Evidence for altered cholesterol metabolism in Huntington's disease post mortem brain tissue. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 42: 535-546.

34
35
36
37
38
39
40 Kruska N, Schönfeld P, Pujol A, Reiser G. 2015. Astrocytes and mitochondria from adrenoleukodystrophy protein (ABCD1)-deficient mice reveal that the adrenoleukodystrophy-associated very long-chain fatty acids target several cellular energy-dependent functions. *Biochim Biophys Acta* 1852: 925-936.

44
45
46
47
48
49
50
51
52 Kunzelmann K. 2016. Ion channels in regulated cell death. *Cell Mol Life Sci*. 73: 2387-2403.

53
54
55
56
57
58
59
60
Leoni V, Caccia C. 2013. 24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. *Biochimie* 95: 595-612.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Leoni V, Lütjohann D, Masterman T. 2005. Levels of 7-oxocholesterol in cerebrospinal fluid are more than one thousand times lower than reported in multiple sclerosis. *J Lipid Res* 46: 191-195.

Leoni V, Masterman T, Diczfalusy U, De Luca G, Hillert J, Björkhem I. 2002. Changes in human plasma levels of the brain specific oxysterol 24S-hydroxycholesterol during progression of multiple sclerosis. *Neurosci. Lett* 331: 163–166.

Leoni V, Solomon A, Lövgren-Sandblom A, Minthon L, Blennow K, Hansson O, Wahlund LO, Kivipelto M, Björkhem I. 2013. Diagnostic power of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid: candidate marker of brain health. *J Alzheimers Dis* 36: 739-747.

Leung YM. 2010. Voltage-gated K⁺ channel modulators as neuroprotective agents. *Life Sci* 86: 775-780.

Liu D, Pitta M, Lee JH, Ray B, Lahiri DK, Furukawa K, Mughal M, Jiang H, Villarreal J, Cutler, RG, Greig, NH, Mattson MP. 2010. The KATP channel activator diazoxide ameliorates amyloid- β and tau pathologies and improves memory in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dis* 22: 443–457.

Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard JP. 1995. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry* 21: 275–283.

1
2
3
4
5
6 Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW. 1999. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a
7 mediator of cholesterol homeostasis in the brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 7238-7243.
8
9

10
11
12 Luneau CJ, Williams JB, Marshall J, Levitan ES, Oliva C, Smith JS, Antanavage J, Folander K,
13 Stein RB, Swanson R. 1991. Alternative splicing contributes to K⁺ channel diversity in the
14 mammalian central nervous system. Proc Natl Acad Sci USA 88: 3932-3936.
15
16
17
18

19
20
21 Lütjohann D, Papassotiropoulos A, Björkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, Schlegel U,
22 Jessen F, Rao ML, von Bergmann K, Heun R. 2000. Plasma 24S-hydroxycholesterol
23 (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. J Lipid Res 41: 195-
24 198.
25
26
27
28
29
30
31
32

33 Mackrill JJ. 2011. Oxysterols and calcium signal transduction. Chem. Phys. Lipids 164: 488–495.

34 Maxfield FR, Tabas I. 2005. Role of cholesterol and lipid organization in disease. Nature 438:
35 612-621.
36
37
38
39
40
41

42 Maxfield FR, Tabas I. 2005. Role of cholesterol and lipid organization in disease. Nature. 438:
43 612-621.
44
45
46
47
48
49

50 Mukhopadhyay S, Fellows K, Browne RW, Khare P, Krishnan Radhakrishnan S, Hagemeyer J,
51 Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Ramanathan M. 2016. Interdependence of oxysterols with
52 cholesterol profiles in multiple sclerosis. Mult Scler. pii: 1352458516666187.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 Mutemberezi V, Guillemot-Legris O, Muccioli GG. 2016. Oxysterols: From cholesterol
7 metabolites to key mediators. *Prog Lipid Res* 64: 152-169.
8
9

10
11
12
13 Noguchi N, Urano Y, Takabe W, Saito Y. 2015. New aspects of 24S-hydroxycholesterol
14 inmodulating neuronal cell death. *Free Radic Biol Med* 87: 366-372.
15
16
17

18
19
20 Nury T, Zarrouk A, Vejux A, Doria M, Riedinger JM, Delage-Mourroux R, Lizard G. 2014.
21 Induction of oxiaoptophagy, a mixed mode of cell death associated with oxidative stress,
22 apoptosis and autophagy, on 7-ketocholesterol-treated 158N murine oligodendrocytes:
23 impairment by α -tocopherol. *Biochem Biophys Res Commun*. 446: 714-719.
24
25
26
27
28

29
30
31 Nury T, Zarrouk A, Mackrill JJ, Samadi M, Durand P, Riedinger JM, Doria M, Vejux A,
32 Limagne E, Delmas D, Prost M, Moreau T, Hammami M, Delage-Mourroux R, O'Brien NM,
33 Lizard G. 2015. Induction of oxiaoptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-
34 ketocholesterol-, 7 β -hydroxycholesterol-, or 24(S)-hydroxycholesterol: Protective effects of α -
35 tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3). *Steroids* 99: 194–203.
36
37
38
39
40
41
42

43
44
45 Nury T, Zarrouk A, Ragot K, Debbabi M, Riedinger JM, Vejux A, Aubourg P, Lizard G. 2016. 7-
46 Ketocholesterol is increased in the plasma of X-ALD patients and induces peroxisomal
47 modifications in microglial cells: Potential roles of 7-ketocholesterol in the pathophysiology of
48 X-ALD. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* pii: S0960-0760(16)30094-2. doi:
49 10.1016/j.jsbmb.2016.03.037.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 Olivier E, Dutot M, Regazzetti A, Leguillier T, Dargère D, Auzeil N, Laprévotte O, Rat P. 2016.
7
8 P2X7-pannexin-1 and amyloid β -induced oxysterol input in human retinal cell: Role in age-
9
10 related macular degeneration? *Biochimie* 127: 70–78.
11
12

13
14
15 Olkkonen VM, Hynynen R. 2009. Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Mol*
16
17 *Aspects Med.* 30: 123-33.
18
19

20
21
22 Ozaita A, Martone ME, Ellisman MH, Rudy B. 2002. Differential subcellular localization of the
23
24 two alternatively spliced isoforms of the Kv3.1 potassium channel subunit in brain. *J*
25
26 *Neurophysiol* 88: 394-408.
27
28

29
30
31 Panza F, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso C, Pichichero G, Capurso SA, Capurso A,
32
33 Solfrizzi V. 2006. Lipid metabolism in cognitive decline and dementia. *Brain Res Rev* 51: 275-
34
35 292.
36
37

38
39
40 Perney TM, Marshall J, Martin KA, Hockfield S, Kaczmarek LK. 1992. Expression of the
41
42 mRNAs for the Kv3.1 potassium channel gene in the adult and developing rat brain. *J*
43
44 *Neurophysiol.* 68: 756-766.
45
46

47
48
49 Petrov AM, Kasimov MR, Zefirov AL. 2016. Brain cholesterol metabolism and its defects:
50
51 linkage to neurodegenerative diseases and synaptic dysfunction. *Acta Naturae* 8: 58-73.
52
53

54
55
56 Pini L, Pievani M, Bocchetta M, Altomare D, Bosco P, Cavedo E, Galluzzi S, Marizzoni M,
57
58 Frisoni GB. 2016. Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. *Ageing Res Rev* 30: 25-48.
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9 Plant LD, Boyle JP, Thomas NM, Hipkins NJ, Benedikz E, Hooper NM, Henderson Z, Vaughan
10 PF, Peers C, Cowburn RF, Pearson HA. 2002. Presenilin-1 mutations alter K⁺ currents in the
11 human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y. *Neuroreport* 13: 1553-1556.
12
13
14
15
16

17 Popp J, Meichsner S, Kölsch H, Lewczuk P, Maier W, Kornhuber J, Jessen F, Lütjohann D.
18 2013. Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer's
19 disease. *Biochem Pharmacol* 86: 37-42.
20
21
22
23
24
25

26 Porter FD, Scherrer DE, Lanier MH, Langmade SJ, Molugu V, Gale SE, Olzeski D, Sidhu R,
27 Dietzen DJ, Fu R, Wassif CA, Yanjanin NM, Marso SP, House J, Vite C, Schaffer JE, Ory DS.
28 2010. Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for
29 Niemann-Pick C1 disease. *Sci Transl Med* 2: 56ra81.
30
31
32
33
34

35 Ragot K, Mackrill JJ, Zarrouk A, Nury T, Aires V, Jacquin A, Athias A, Pais de Barros JP, Véloux
36 A, Riedinger JM, Delmas D, Lizard G. 2013. Absence of correlation between oxysterol
37 accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N
38 murine oligodendrocytes. *Biochem. Pharmacol* 86: 67-79.
39
40
41
42
43
44
45
46

47 Romanello M, Zampieri S, Bortolotti N, Deroma L, Sechi A, Fiumara A, Parini R, Borroni B,
48 Brancati F, Bruni A, Russo CV, Bordugo A, Bembi B, Dardis A. 2016. Comprehensive
49 Evaluation of Plasma 7-Ketocholesterol and Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -Triol in an Italian Cohort of
50 Patients Affected by Niemann-Pick Disease due to NPC1 and SMPD1 Mutations. *Clin Chim*
51 *Acta* 455: 39-45.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 Rothe G, Valet G. 1990. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with
7 hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol* 47: 440-448.
8
9

10
11
12 Rudy B, Chow A, Lau D, Amarillo Y, Ozaita A, Saganich M, Moreno H, Nadal MS, Hernandez-
13 Pineda R, Hernandez-Cruz A, Erisir A, Leonard C, Vega-Saenz de Miera E. 1999. Contributions
14 of Kv3 channels to neuronal excitability. *Ann N Y Acad Sci* 868: 304-343.
15
16
17
18

19
20
21 Rudy B, McBain CJ. 2001. Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-
22 frequency repetitive firing. *Trends Neurosci* 24: 517-526.
23
24
25
26

27
28
29 Russell DW, Halford RW, Ramirez DM, Shah R, Kotti T. 2009. Cholesterol 24-hydroxylase: an
30 enzyme of cholesterol turnover in the brain. *Annu Rev Biochem* 78: 1017-1040.
31
32
33

34
35
36 Schönfeld P, Reiser G. 2016. Brain Lipotoxicity of Phytanic Acid and Very Long-chain Fatty
37 Acids. Harmful Cellular/Mitochondrial Activities in Refsum Disease and X-Linked
38 Adrenoleukodystrophy. *Aging Dis* 7: 136-149.
39
40
41
42

43
44
45 Senanayake VK, Jin W, Mochizuki A, Chitou B, Goodenowe DB. 2015. Metabolic dysfunctions
46 in multiple sclerosis: implications as to causation, early detection, and treatment, a case control
47 study. *BMC Neurol* 15: 154.
48
49
50

51
52
53
54 Sesti F. 2016. Oxidation of K⁽⁺⁾ Channels in Aging and Neurodegeneration. *Aging Dis* 7: 130-
55 135.
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 Shafaati M, Solomon A, Kivipelto M, Björkhem I, Leoni V. 2007. Levels of ApoE in
7
8 cerebrospinal fluid are correlated with Tau and 24S-hydroxycholesterol in patients with cognitive
9
10 disorders. *Neurosci Lett* 425: 78-82.
11

12
13
14
15 Singh I, Pujol A. 2010. Pathomechanisms underlying X-adrenoleukodystrophy: a three-hit
16
17 hypothesis. *Brain Pathol* 20: 838-844.
18

19
20
21
22 Solomon A, Leoni V, Kivipelto M, Besga A, Oksengård AR, Julin P, Svensson L, Wahlund LO,
23
24 Andreasen N, Winblad B, Soininen H, Björkhem I. 2009. Plasma levels of 24S-
25
26 hydroxycholesterol reflect brain volumes in patients without objective cognitive impairment but
27
28 not in those with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 462: 89-93.
29

30
31
32
33 Song P, Kaczmarek LK. 2006. Modulation of Kv3.1b potassium channel phosphorylation in
34
35 auditory neurons by conventional and novel protein kinase C isozymes. *J Biol Chem* 281: 15582-
36
37 15591.
38

39
40
41
42 Sun MY, Izumi Y, Benz A, Zorumski CF, Mennerick S. 2016. Endogenous 24S-
43
44 hydroxycholesterol modulates NMDAR-mediated function in hippocampal slices. *J Neurophysiol*
45
46 115: 1263-1272.
47

48
49
50
51 Takemoto Y, Suzuki Y, Horibe R, Shimosawa N, Wanders RJ, Kondo N. 2003. Gas
52
53 chromatography/mass spectrometry analysis of very long chain fatty acids, docosahexaenoic
54
55 acid, phytanic acid and plasmalogen for the screening of peroxisomal disorders. *Brain Dev* 25:
56
57 481-487.
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9 Tanaka T, Yoshida S. 2014. Mechanisms of remyelination: recent insight from experimental
10 models. *Biomol Concepts* 5: 289-298.

11
12
13
14
15 Testa G, Staurengi E, Zerbinati C, Gargiulo S, Iuliano L, Giaccone G, Fantò F, Poli G,
16 Leonarduzzi G, Gamba P. 2016. Changes in brain oxysterols at different stages of Alzheimer's
17 disease: Their involvement in neuroinflammation. *Redox Biol* 10: 24-33.

18
19
20
21
22
23
24 Tiwari-Woodruff S, Beltran-Parrazal L, Charles A, Keck T, Vu T, Bronstein J. 2006. K⁺ channel
25 KV3.1 associates with OSP/claudin-11 and regulates oligodendrocyte development. *Am J*
26
27 *Physiol Cell Physiol* 291: C687-C698.

28
29
30
31
32
33 Trompier D, Vejux A, Zarrouk A, Gondcaille C, Geillon F, Nury T, Savary S, Lizard G. 2014.
34
35 Brain peroxisomes. *Biochimie* 98: 102-110.

36
37
38
39
40 Ukpong B. Eyo, Michael E. 2013. Dailey Microglia: Key Elements in Neural Development,
41
42 Plasticity, and Pathology *Neuroimmune Pharmacol. J Neuroimmune Pharmacol.* 8: 494–509.

43
44
45
46
47 Vaya J, Schipper HM. 2007. Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J*
48
49 *Neurochem* 102: 1727-1737.

50
51
52
53
54 Vejux A, Lizard G. 2009. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases:
55
56 Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and
57
58 phospholipidosis. *Mol Aspects Med* 30: 153-170.
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Wanders RJ, Ferdinandusse S, Brites P, Kemp S. 2010. Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1801: 272-280.

Wanders RJ. 2014. Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie* 98: 36-44.

Wei T, Yi M, Gu W, Hou L, Lu Q, Yu Z, Chen H. 2017. The Potassium Channel KCa3.1 Represents a Valid Pharmacological Target for Astrogliosis-Induced Neuronal Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Pharmacol* 7: 528.

Weiser M, Vega-Saenz de Miera E, Kentros C, Moreno H, Franzen L, Hillman D, Baker H, Rudy B. 1994. Differential expression of Shaw-related K⁺ channels in the rat central nervous system. *J Neurosci* 14: 949-972.

Wood WG, Li L, Müller WE, Eckert GP. 2014. Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *J Neurochem* 129: 559-572.

Wu CY, Kaur C, Sivakumar V, Lu J, Ling EA. 2009. Kv1.1 expression in microglia regulates production and release of proinflammatory cytokines, endothelins and nitric oxide. *Neuroscience* 158: 1500-1508.

1
2
3
4
5
6 Wu YH, Arnaud-Cormos D, Casciola M, Sanders JM, Leveque P, Vernier PT. 2013. Moveable
7
8 wire electrode microchamber for nanosecond pulsed electric-field delivery. *IEEE Trans Biomed*
9
10 *Eng* 60: 489-496.

11
12
13
14
15 Yadav RS, Tiwari NK. 2014. Lipid integration in neurodegeneration: an overview of Alzheimer's
16
17 disease. *J Mol Neurobiol* 50: 168-176.

18
19
20
21
22 Yaron JR, Gangaraju S, Rao MY, Kong X, Zhang L, Su F, Tian Y, Glenn HL, Meldrum DR.
23
24 2015. K(+) regulates Ca(2+) to drive inflammasome signaling: dynamic visualization of ion flux
25
26 in live cells. *Cell Death Dis* 6: e1954.

27
28
29
30
31 Yu SP, Yeh CH, Sensi SL, Gwag BJ, Canzoniero LM, Farhangrazi ZS, Ying HS, Tian M, Dugan
32
33 LL, Choi DW. 1997. Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium
34
35 current. *Science* 278: 114-117.

36
37
38
39
40 Yu SP. 2003. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog Neurobiol*
41
42 70: 363-386.

43
44
45
46
47 Zarrouk A, Vejux A, Mackrill J, O'Callaghan Y, Hammami M, O'Brien N, Lizard G. 2014.
48
49 Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Res Rev* 18: 148-
50
51 162.

52
53
54
55
56 Zarrouk A, Hammami M, Moreau T, Lizard G. 2015a. Accumulation of 24S-hydroxycholesterol
57
58 in neuronal SK-N-BE cells treated with hexacosanoic acid(C26:0): argument in favor of 24S-
59
60

1
2
3
4
5
6 hydroxycholesterol as a potential biomarker of neurolipotoxicity. *Rev Neurol (Paris)* 171: 125-
7
8 129.
9

10
11
12
13 Zarrouk A, Riedinger JM, Ahmed SH, Hammami S, Chaabane W, Debbabi M, Ben Ammou S,
14
15 Rouaud O, Frih M, Lizard G, Hammami M. 2015b. Fatty acid profiles in demented patients:
16
17 identification of hexacosanoic acid (C26:0) as a blood lipid biomarker of dementia. *J Alzheimers*
18
19 *Dis* 44: 1349-1359.
20
21

22
23
24 Zarrouk A, Nury T, Dauphin A, Frère P, Riedinger JM, Bachelet CM, Frouin F, Moreau T,
25
26 Hammami M, Kahn E, Lizard G, 2015c. Impact of C24:0 on actin-microtubule interaction in
27
28 human neuronal SK-N-BE cells: evaluation by FRET confocal spectral imaging microscopy after
29
30 dual staining with rhodamine-phalloidin and tubulin tracker green. *Funct. Neurol* 30: 33–46.
31
32
33

34
35
36 Zarrouk A, Nury T, Samadi M, O'Callaghan Y, Hammami M, O'Brien NM, Lizard G, Mackrill
37
38 JJ. 2015d. Effects of cholesterol oxides on cell death induction and calcium increase in human
39
40 neuronal cells (SK-N-BE) and evaluation of the protective effects of docosahexaenoic acid
41
42 (DHA; C22:6 n-3). *Steroids* 99: 238-247.
43
44
45

46
47
48 Zhornitsky, S., McKay, K.A., Metz, L.M., Teunissen, C.E., Rangachari, M., 2016. Cholesterol
49
50 and markers of cholesterol turnover in multiple sclerosis: relationship with disease outcomes.
51
52 *Mult Scler Relat Disord* 5: 53-65.
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Analysis of the expression of the Kv3.1 voltage-gated potassium channel in 158N murine oligodendrocytes and BV-2 murine microglial cells. **A:** Flow cytometric analysis of the expression of Kv3.1 on 158N and BV-2 cells; **B:** immunofluorescence microscopy; Kv3.1 expression (green); the nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue); **C:** analysis of Kv3.1b protein expression by Western blot in 158N and BV-2 cells; a single band at around 66 kDa corresponding to the core Kv3.1b was detected.

Figure 2: Analysis of Kv3.1b expression in 158N murine oligodendrocytes treated with 7KC, 24S-OHC and C24:0. Subconfluent 158N cells (previously cultured for 24 h) were further incubated for 24 h without or with 7KC (2.5 to 25 μ M), 24S-OHC (2.5 to 25 μ M), and C24:0 (1 to 20 μ M) as well as with EtOH (0.005 to 0.05%; used as vehicle for 7KC and 24S-OHC) and with α -cyclodextrin (0.05 to 1 mM; used as vehicle for C24:0). Kv3.1b expression was evaluated by flow cytometry (data were expressed as % of control (untreated cells)) (**A**) and western blotting (data were normalized to β -actin used as reference protein and expressed as % control) (**B**). Data shown are mean \pm SD from three independent experiments. Statistical analyses were realized with ANOVA (Tukey's multiple comparisons test): # $P < 0.05$ vehicle / control; * $P < 0.05$ oxysterols or tetracosanoic acid / vehicle.

Figure 3: Analysis of Kv3.1b expression in BV-2 murine microglial cells treated with 7KC, 24S-OHC and C24:0. BV-2 cells previously cultured for 24 h were further incubated for 24 and

1
2
3
4
5
6 48 h without or with 7KC (2.5 to 25 μ M), 24S-OHC (2.5 to 25 μ M) and C24:0 (1 to 20 μ M) as
7
8 well as with EtOH (0.005 to 0.05%; used as vehicle for 7KC and 24S-OHC) and with α -
9 cyclodextrin (0.05 to 1 mM; used as vehicle for C24:0). Kv3.1b expression (MFI) was evaluated
10
11 by flow cytometry after 24 h (A) and 48 h (B). Data are expressed as % of control (untreated
12
13 cells). Data shown are mean \pm SD from three independent experiments. Statistical analyses were
14
15 realized with ANOVA (Tukey's multiple comparisons test): # $P < 0.05$ vehicle / control; * $P <$
16
17 0.05 oxysterols or tetracosanoic acid / vehicle.
18
19
20
21
22
23
24

25 **Figure 4: Effects of 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol and tetracosanoic acid on**
26 **intracellular K^+ concentration ($[K^+]_i$) evaluated with flame photometry.** 158N and BV-2
27
28 cells previously cultured for 24 h were further cultured without or with 7KC (2.5 to 25 μ M), 24S-
29
30 OHC (2.5 to 25 μ M), and C24:0 (1 to 20 μ M) as well as with EtOH (0.005 to 0.05%; used as
31
32 vehicle for 7KC and 24S-OHC) and with α -cyclodextrin (0.05 to 1 mM; used as vehicle for
33
34 C24:0). 4-AP was used as positive control to induce intracellular K^+ accumulation. $[K^+]_i$ was
35
36 measured by flame photometry after 24 h of treatment in 158N cells (A), or after 24 h (B) and 48
37
38 h of treatment (C) in BV-2 cells. Data are expressed as % of control (untreated cells). Values are
39
40 mean \pm SD of three independent experiments. Statistical analyses were realized with ANOVA
41
42 (Tukey's multiple comparisons test). Significant differences are indicated as: # $P < 0.05$ vehicle
43
44 (or 4-AP) / control; * $P < 0.05$, vehicle / 7KC, 24S-OHC or C24:0.
45
46
47
48
49
50
51
52

53 **Figure 5: Pearson's correlation between Kv3.1b expression and intracellular K^+**
54 **concentration ($[K^+]_i$) evaluated in 158 N murine oligodendrocytes and BV-2 murine**
55 **microglial cells treated with 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol or C24:0.** 158N (a-c)
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 and BV-2 (d-i) cells previously cultured for 24 h were further cultured (for 24 h (158N) or 24-48
7 h (BV-2)) without or with 7KC (2.5 to 25 μ M), 24S-OHC (2.5 to 25 μ M), and C24:0 (1 to 20
8 μ M) as well as with EtOH (0.005 to 0.05 %; used as vehicle for 7KC and 24S-OHC) and with α -
9 cyclodextrin (0.05 to 1 mM; used as vehicle for C24:0). Kv3.1b expression level was evaluated
10 by flow cytometry (MFI) and $[K^+]_i$ was determined by flame photometry. Data are expressed as
11 % of control (untreated cells). The correlations were calculated with the Pearson's correlation
12 test.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

Supplementary Figure 1: Pearson's correlation between Kv3.1b expression, the percentage of DiOC₆(3)-negative cells, and DHE- and PI-positive cells in 158N murine oligodendrocytes treated for 24 h with 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol or C24:0. Subconfluent 158N cells (previously cultured for 24 h) were further incubated for 24 h without or with 7KC (2.5 to 25 μ M), 24S-OHC (2.5 to 25 μ M), and C24:0 (1 to 20 μ M) as well as with EtOH (0.005 to 0.05%; used as vehicle for 7KC and 24S-OHC) and with α -cyclodextrin (0.05 to 1 mM; used as vehicle for C24:0). Kv3.1b expression (MFI) as well as the percentage DiOC₆(3)-negative cells, and DHE- and PI-positive cells were evaluated by flow cytometry. The correlations were calculated with the Pearson's correlation test.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

Supplementary Figure 2: Pearson's correlation between Kv3.1b expression, the percentage of DiOC₆(3)-negative cells, and DHE- and PI-positive cells in BV-2 murine microglial cells treated for 24 h with 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol or C24:0. BV-2 cells (previously cultured for 24 h) were further incubated for 24 h without or with 7KC (2.5 to 25 μ M), 24S-OHC (2.5 to 25 μ M), and C24:0 (1 to 20 μ M) as well as with EtOH (0.005 to 0.05%;
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

used as vehicle for 7KC and 24S-OHC) and with α -cyclodextrin (0.05 to 1 mM; used as vehicle for C24:0). Kv3.1b expression (MFI) as well as the percentage of DiOC₆(3)-negative cells, and DHE- and PI-positive cells were evaluated by flow cytometry. The correlations were calculated with the Pearson's correlation test.

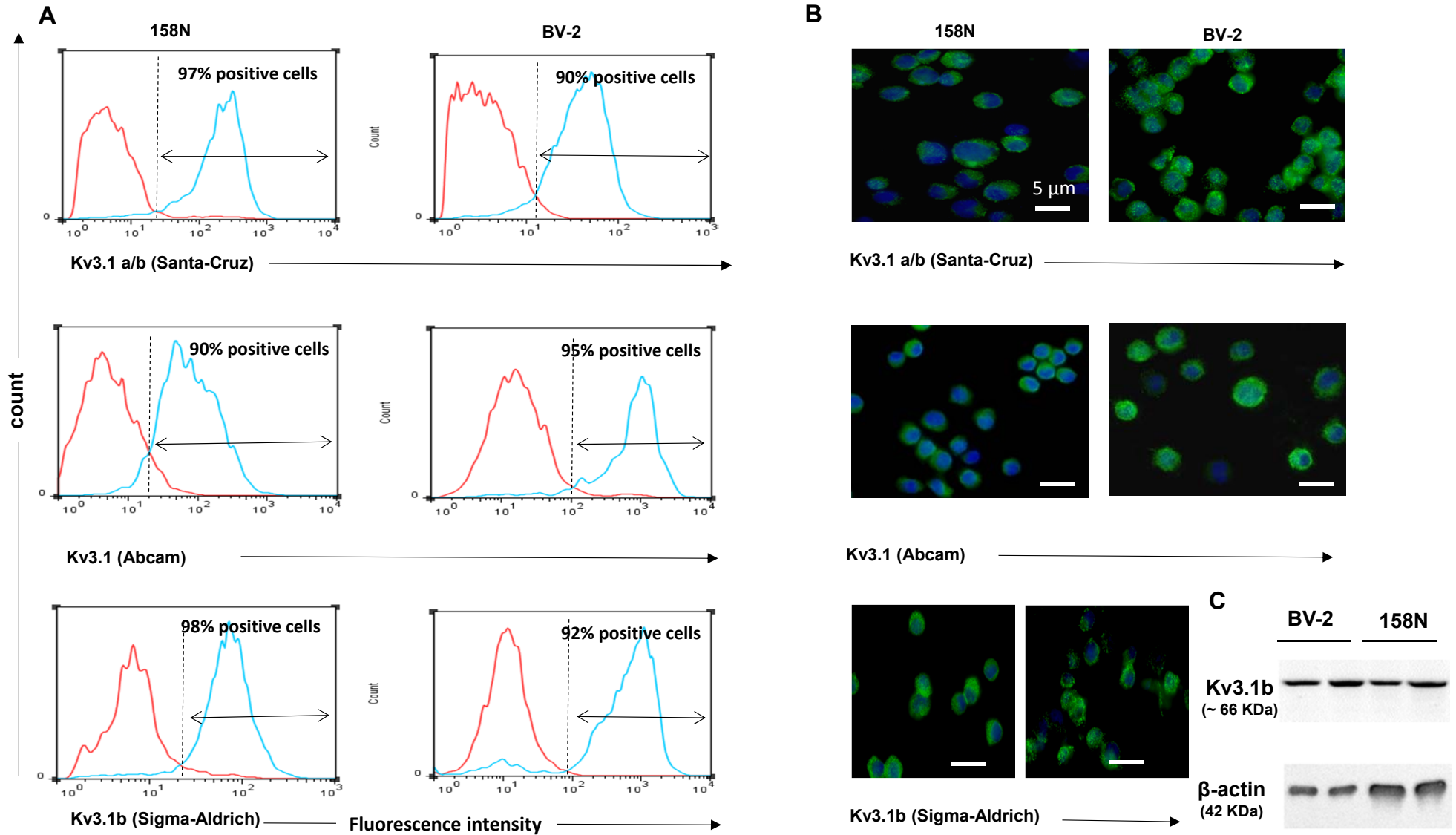
Supplementary Figure 3: Pearson's correlation between Kv3.1b expression, the percentage of DiOC₆(3)-negative cells, and DHE- and PI-positive cells in BV-2 murine microglial cells cultured for 48 h with 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol or C24:0. BV-2 cells (previously cultured for 24 h) were further cultured for 48 h without or with 7KC (2.5 to 25 μ M), 24S-OHC (2.5 to 25 μ M), and C24:0 (1 to 20 μ M) as well as with EtOH (0.005 to 0.05%; used as vehicle for 7KC and 24S-OHC) and with α -cyclodextrin (0.05 to 1 mM; used as vehicle for C24:0). Kv3.1b expression (MFI) as well as the percentage DiOC₆(3)-negative cells, and DHE- and PI-positive cells were evaluated by flow cytometry. The correlations were calculated with Pearson's correlation test.

Supplementary Figure 4: Pearson's correlation between intracellular K⁺ concentration ([K⁺]_i), the percentage of DiOC₆(3)-negative cells, and DHE- and PI-positive cells in 158 N murine oligodendrocytes cultured for 24 h with 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol or C24:0. Subconfluent 158N cells (previously cultured for 24 h) were further cultured for 24 h without or with 7KC (2.5 to 25 μ M), 24S-OHC (2.5 to 25 μ M), and C24:0 (1 to 20 μ M) as well as with EtOH (0.005 to 0.05%; used as vehicle for 7KC and 24S-OHC) and with α -cyclodextrin (0.05 to 1 mM; used as vehicle for C24:0). [K⁺]_i was determined by flame photometry; the

percentages of DiOC₆(3)-negative cells, and DHE- and PI-positive cells were evaluated by flow cytometry. The correlations were calculated with Pearson's correlation test.

Supplementary Figure 5: Pearson's correlation between intracellular K⁺ concentration ([K⁺]_i), the percentage of DiOC₆(3)-negative cells, and DHE- and PI-positive cells in BV-2 murine microglial cells treated for 24 h with 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol or C24:0. BV-2 cells (previously cultured for 24 h) were further cultured for 24 h without or with 7KC (2.5 to 25 μM), 24S-OHC (2.5 to 25 μM), and C24:0 (1 to 20 μM) as well as with EtOH (0.005 to 0.05%; used as vehicle for 7KC and 24S-OHC) and with α-cyclodextrin (0.05 to 1 mM; used as vehicle for C24:0). [K⁺]_i was determined by flame photometry; the percentages of DiOC₆(3)-negative cells, and DHE- and PI-positive cells were evaluated by flow cytometry. The correlations were calculated with Pearson's correlation test.

Supplementary Figure 6: Pearson's correlation between intracellular K⁺ concentration ([K⁺]_i), the percentage of DiOC₆(3)-negative cells, and DHE- and PI-positive cells in BV-2 murine microglial cells treated for 48 h with 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol or C24:0. BV-2 cells (previously cultured for 24 h) were further cultured for 48 h without or with 7KC (2.5 to 25 μM), 24S-OHC (2.5 to 25 μM), and C24:0 (1 to 20 μM) as well as with EtOH (0.005 to 0.05%; used as vehicle for 7KC and 24S-OHC) and with α-cyclodextrin (0.05 to 1 mM; used as vehicle for C24:0). [K⁺]_i was determined by flame photometry; the percentages of DiOC₆(3)-negative cells, and DHE- and PI-positive cells were evaluated by flow cytometry. The correlations were calculated with Pearson's correlation test.

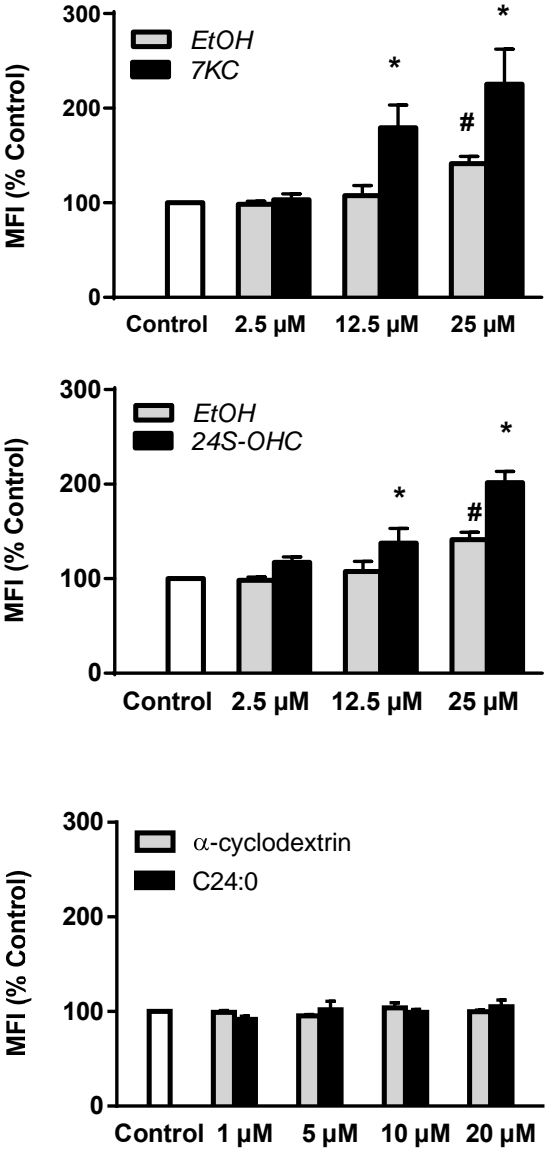


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

Figure 1, Bezine et al.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

A



B

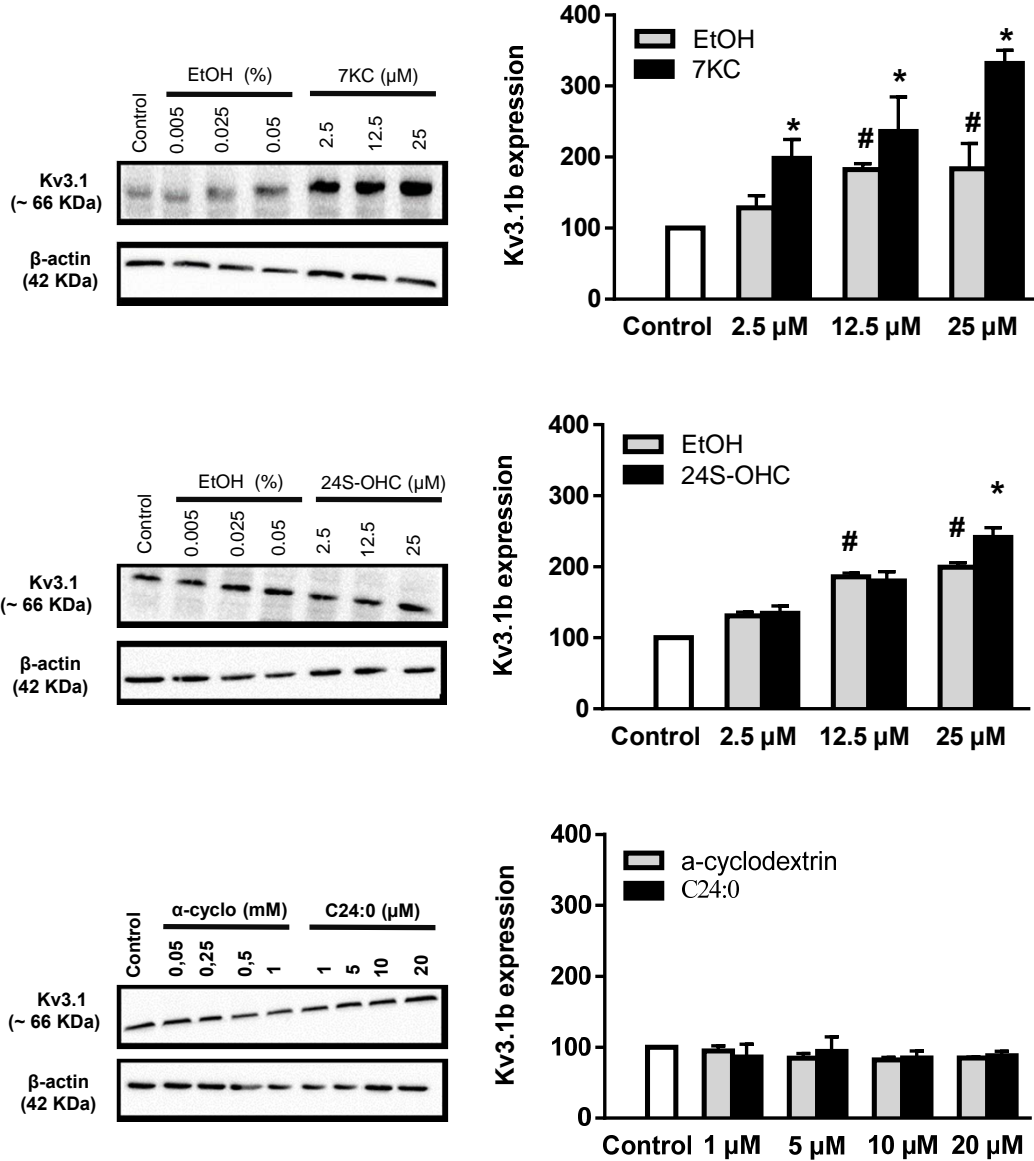


Figure 2, Bezine et al.

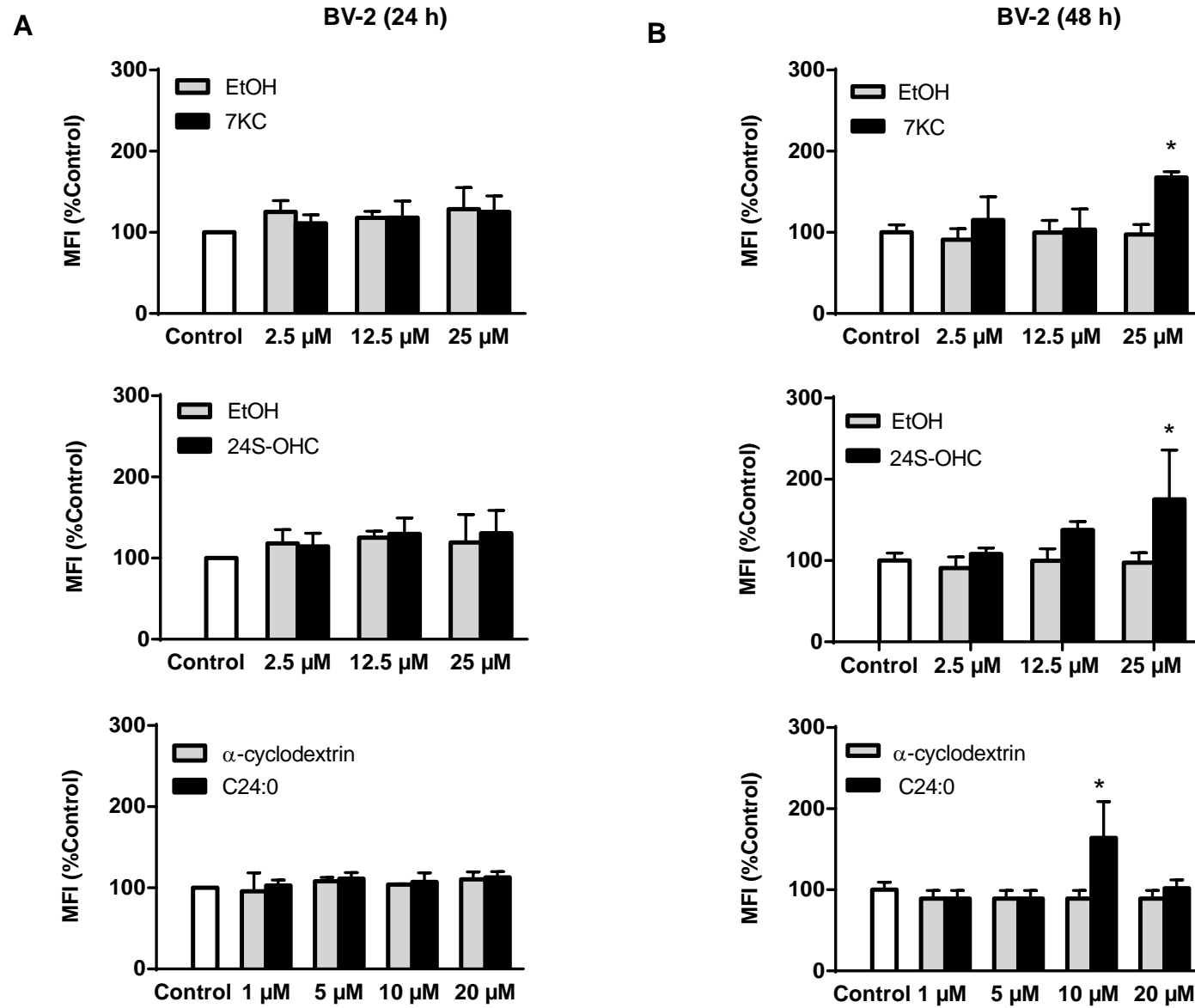


Figure 3, Bezine et al.

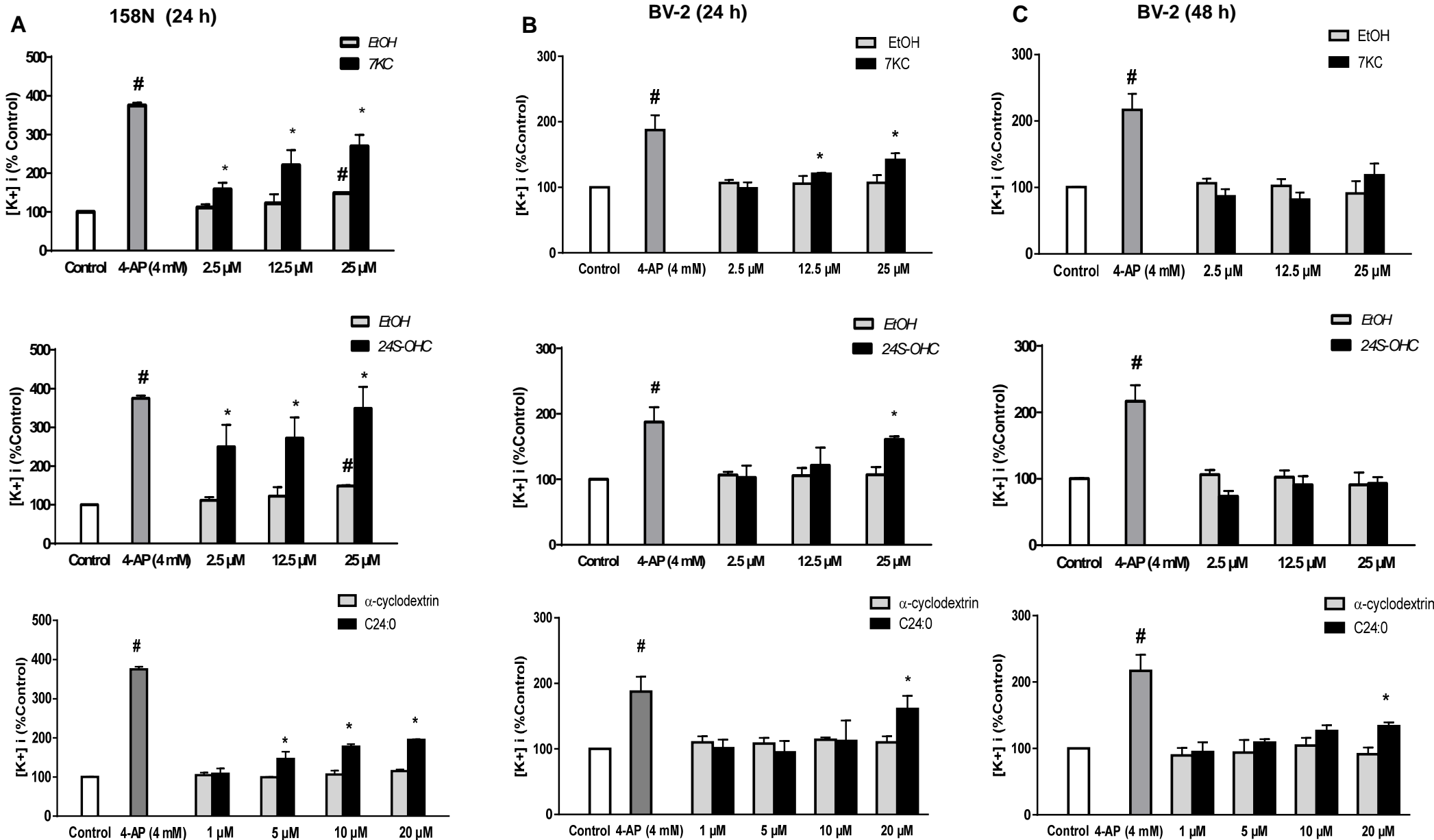


Figure 4 Bezine et al.

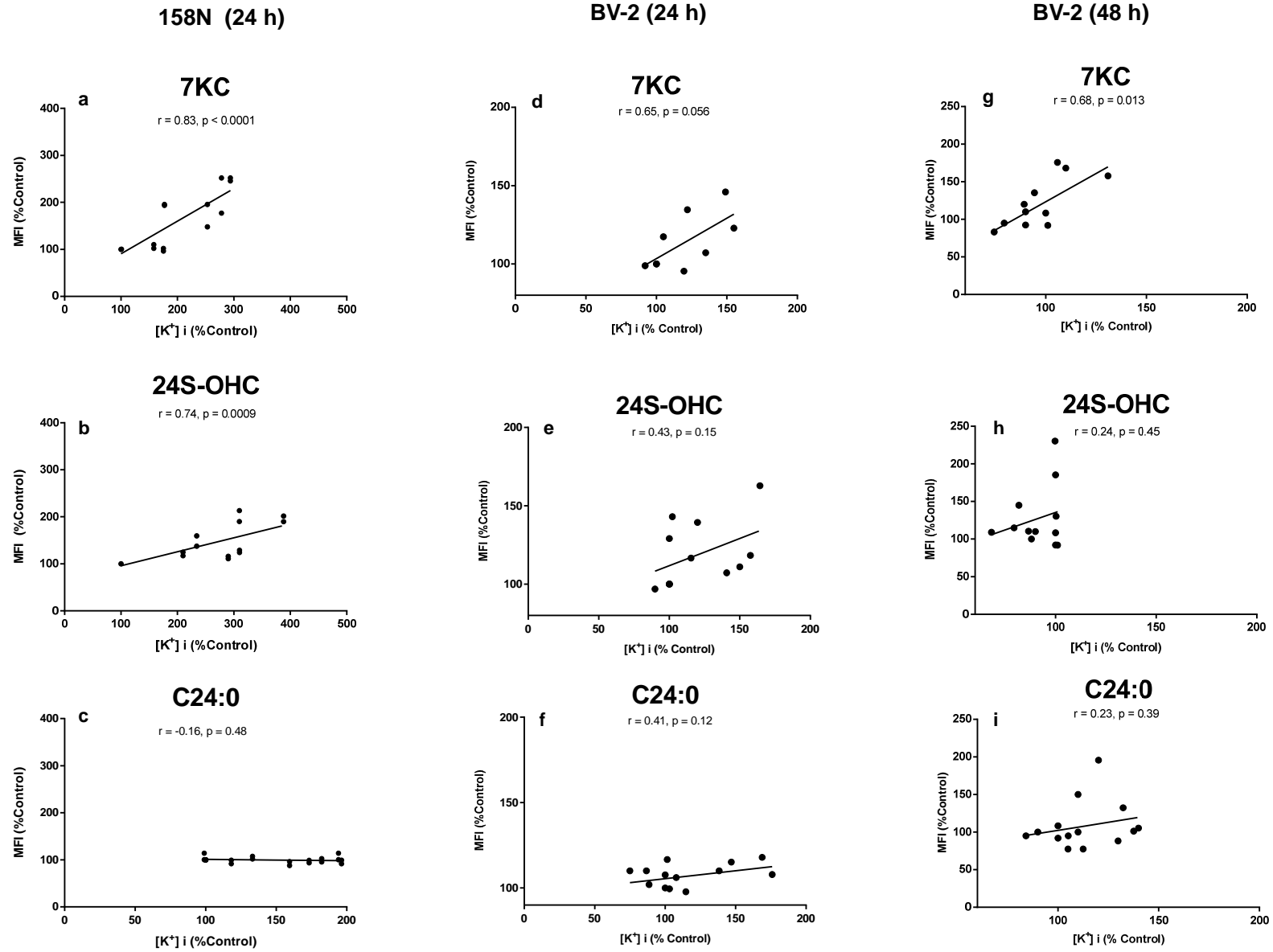


Figure 5, Bezine et al.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

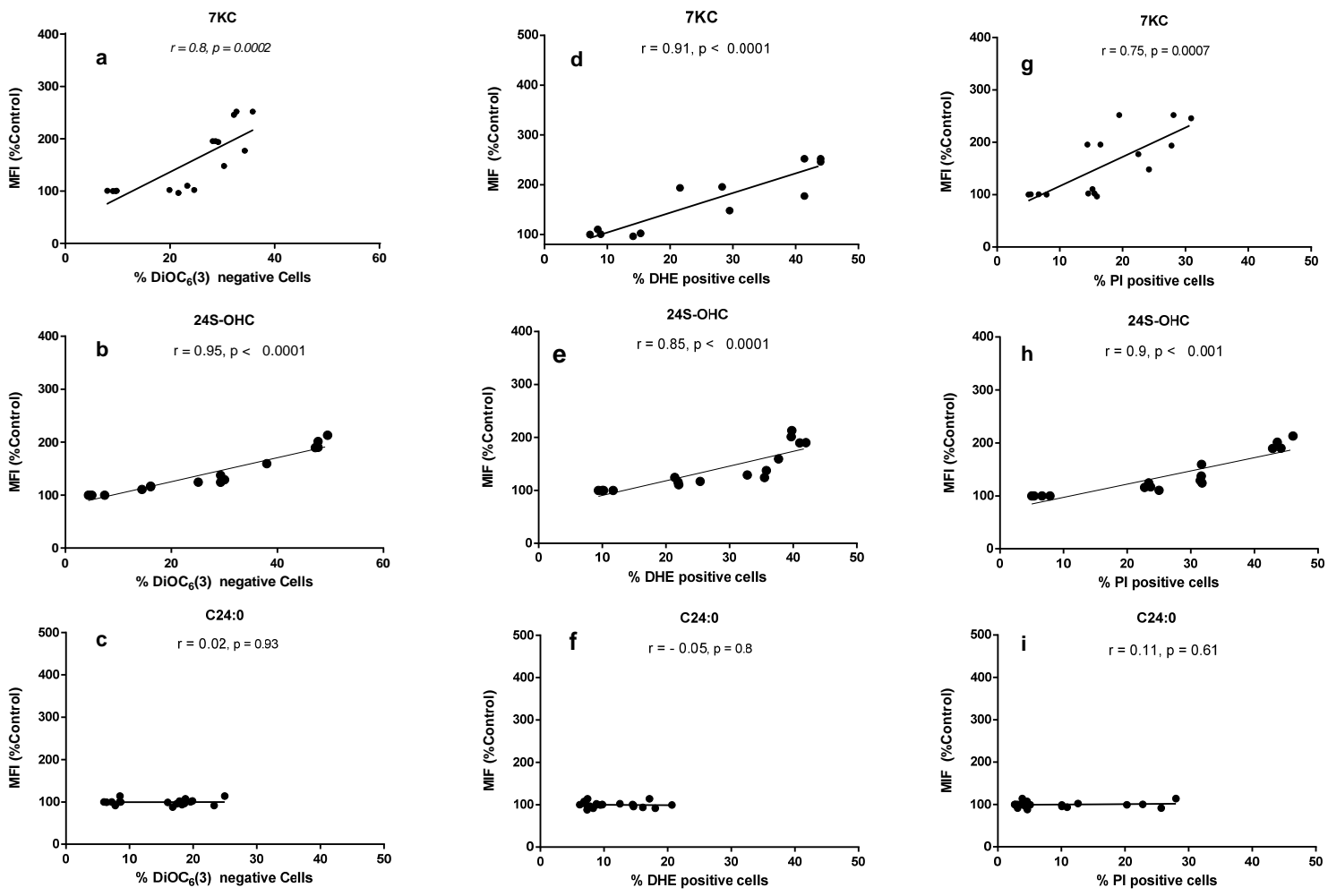
Cells and time of treatment	Kv3.1b levels	% DiOC ₆ (3) negative cells		% DHE positive cells		%IP positive cells	
		r	P	r	P	r	P
158N (24 h)	7KC	0.8	0.0002	0.91	<0.0001	0.75	0.0007
	24 S-OHC	0.95	<0.0001	0.85	<0.0001	0.9	<0.0001
	C24:0	0.2	NS	-0.05	NS	0.11	NS
BV-2 (24 h)	7KC	0.73	0.0013	0.42	NS	0.4	NS
	24 S-OHC	0.55	0.02	0.71	0.0019	0.63	0.0087
	C24:0	0.57	0.007	0.41	NS	0.31	NS
BV-2 (48 h)	7KC	0.6	0.01	0.72	0.0015	0.7	0.002
	24 S-OHC	0.79	0.0002	0.79	0.0002	0.7	0.0015
	C24:0	0.2	NS	-0.24	NS	0.032	NS

Table 1: Pearson's correlation between Kv3.1b expression, the percentage of DiOC₆(3) negative cells, and the percentage of DHE and PI positive cells.

Cells and time of treatment	[K ⁺] _i	% DiOC ₆ (3) negative cells		% DHE positive cells		%IP positive cells	
		<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
158N (24 h)	7KC	0.92	<0.0001	0.94	<0.0001	0.81	<0.0001
	24 S-OHC	0.83	<0.0001	0.86	<0.0001	0.86	<0.0001
	C24:0	0.89	<0.0001	0.8	<0.0001	0.8	0.0002
BV-2 (24 h)	7KC	0.73	0.012	0.92	0.0018	0.85	<0.0001
	24 S-OHC	0.86	0.0003	0.71	0.0018	0.89	<0.0001
	C24:0	0.81	0.001	0.64	0.0019	0.84	0.0002
BV-2 (48 h)	7KC	0.49	0.04	0.5	0.03	0.61	0.011
	24 S-OHC	0.06	NS	-0.14	NS	0.03	NS
	C24:0	0.75	<0.0001	0.47	0.033	0.8	<0.0001

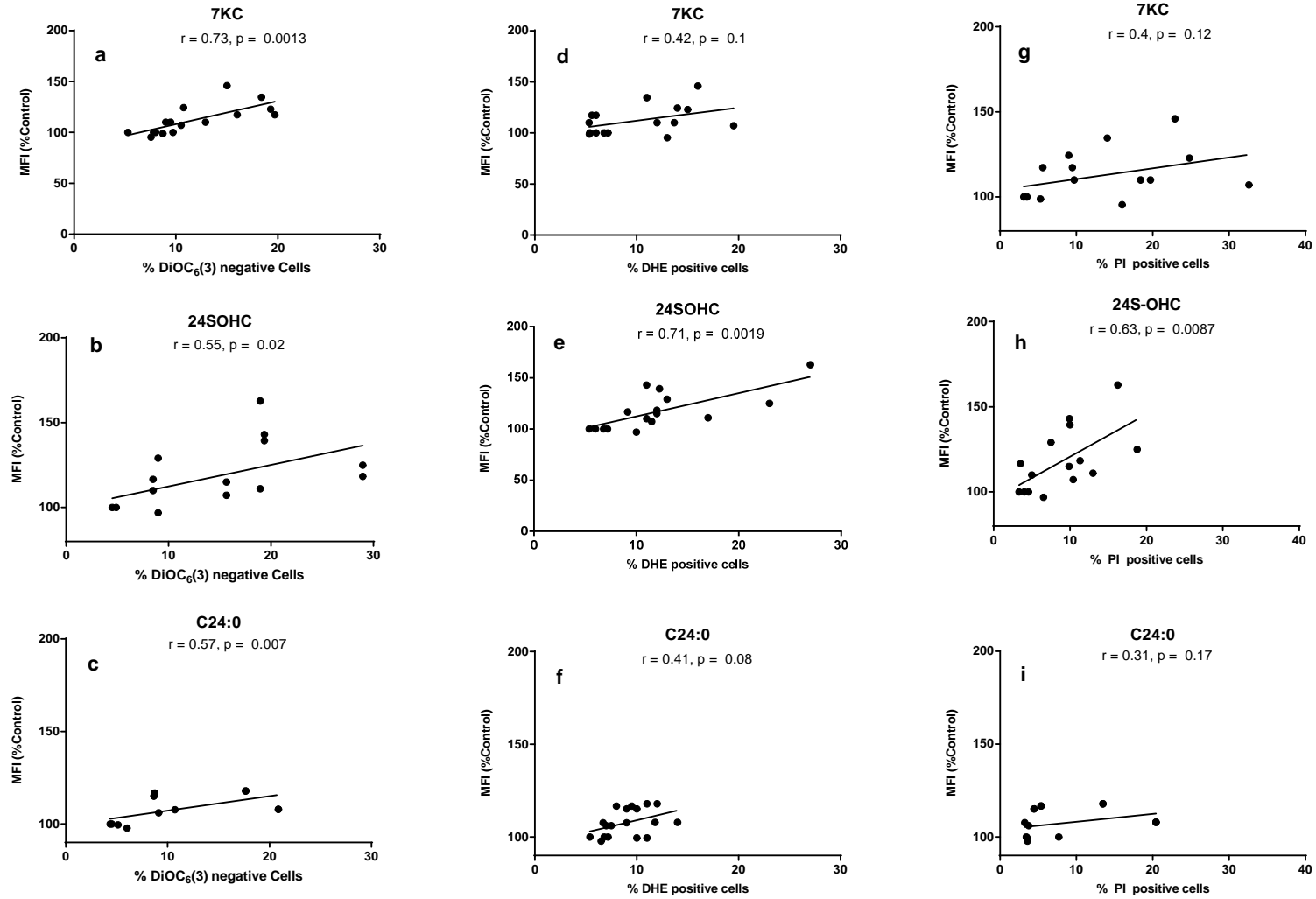
Table 2: Pearson's correlation between intracellular potassium concentration [K⁺]_i, the percentage of DiOC₆(3) negative cells, and the percentage of DHE and PI positive cells.

158N (24 h)



Bezine M et al., Supplementary Figure. 1

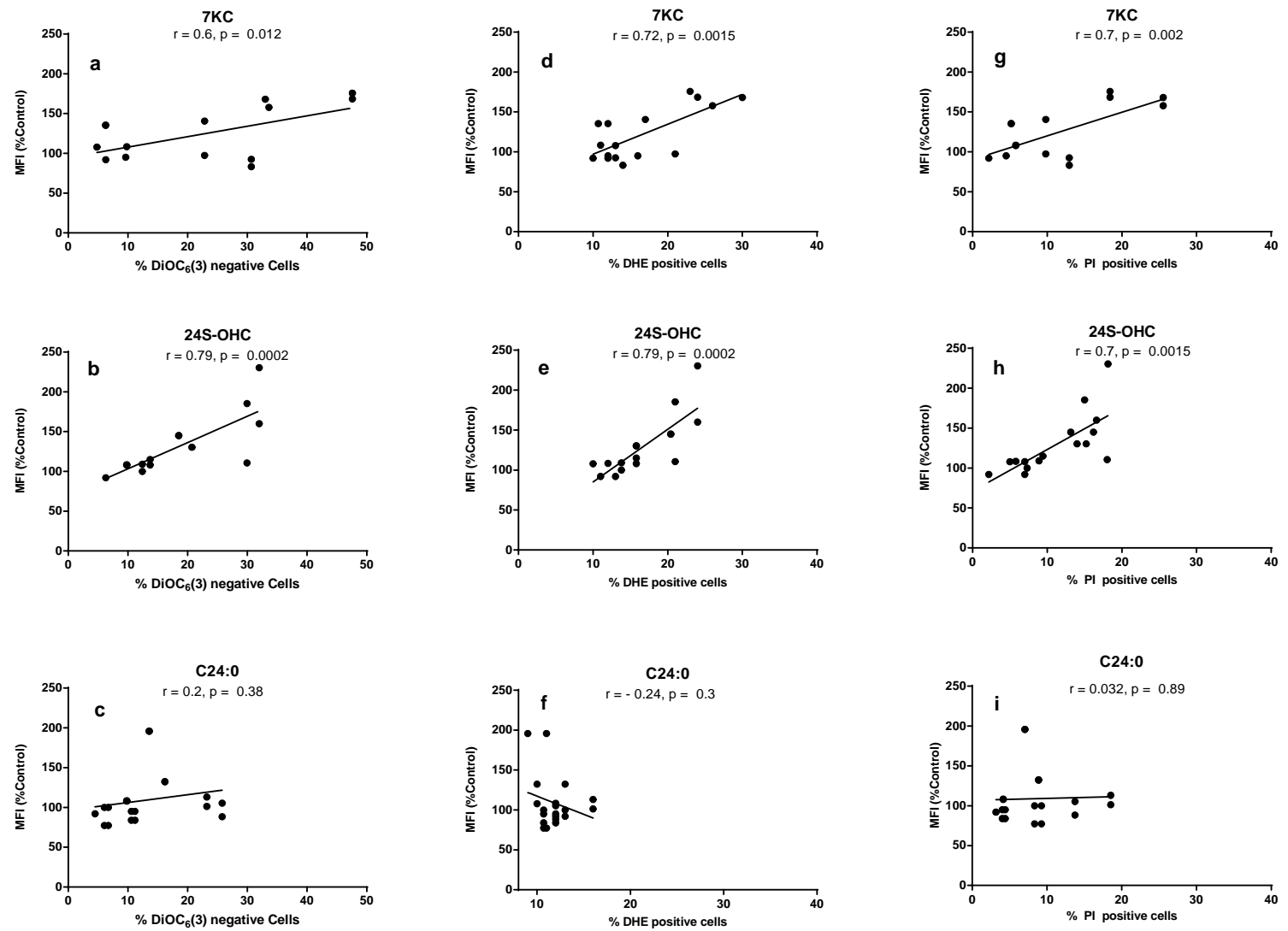
BV-2 (24 h)



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

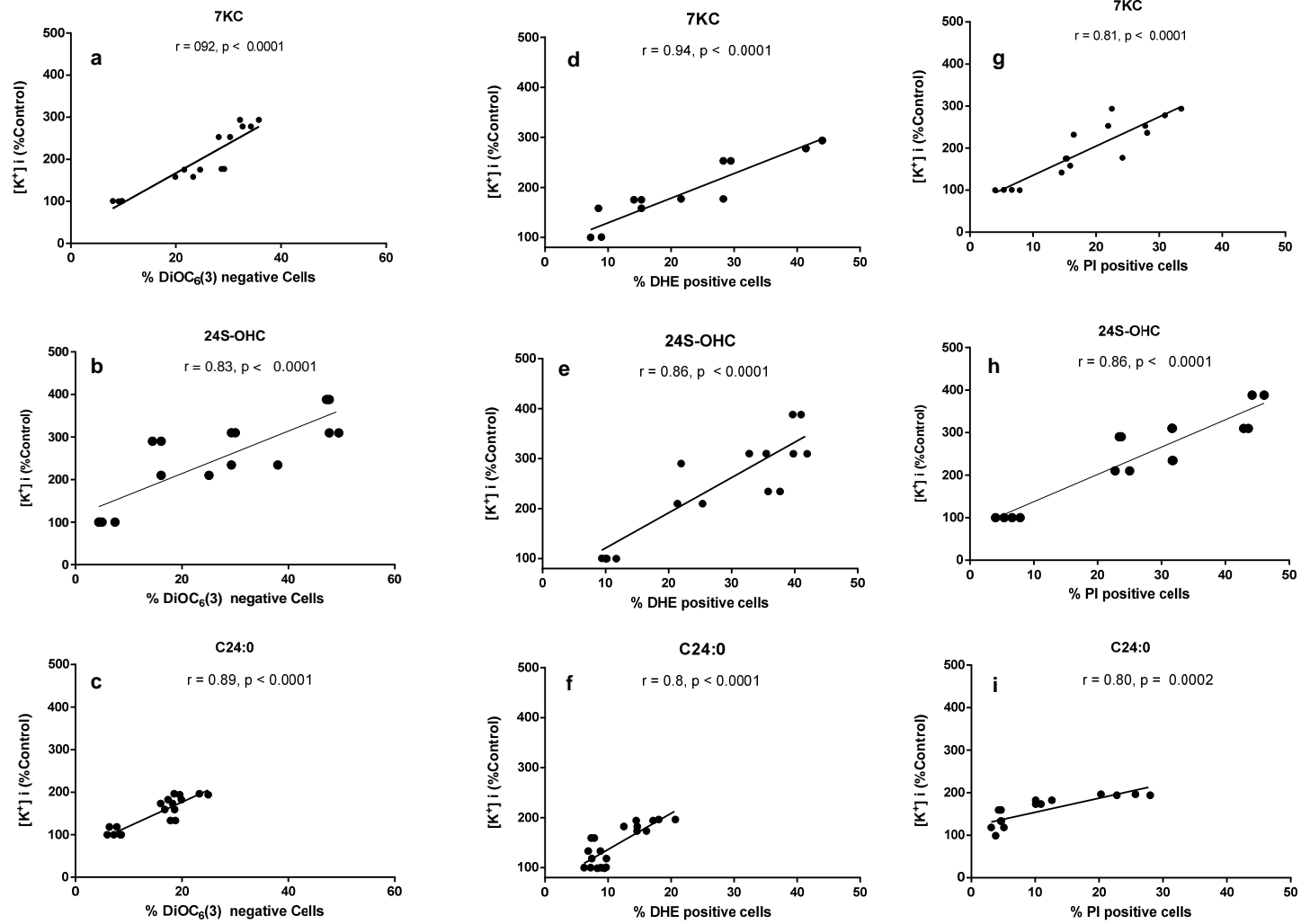
Bezine M et al., Supplementary Fig. 2

BV-2 (48 h)



Bezine M et al., Supplementary Fig. 3

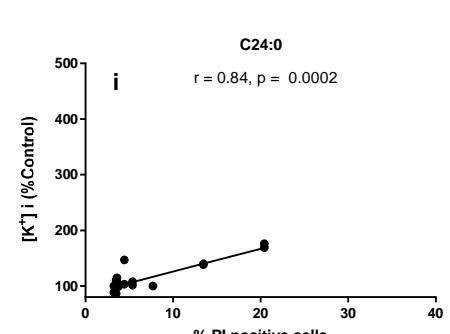
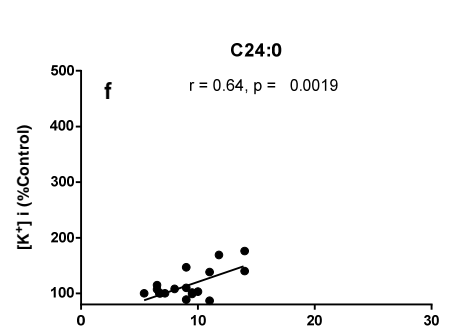
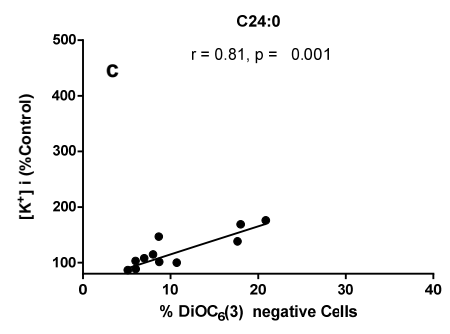
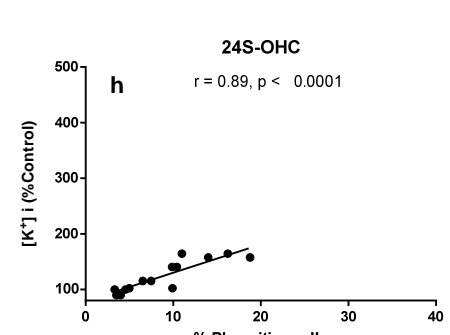
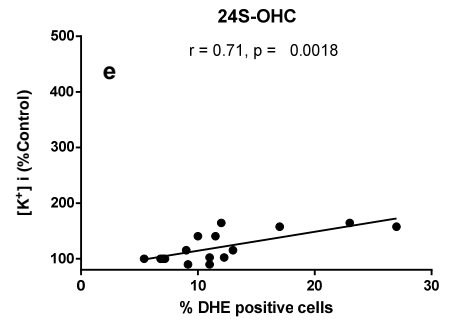
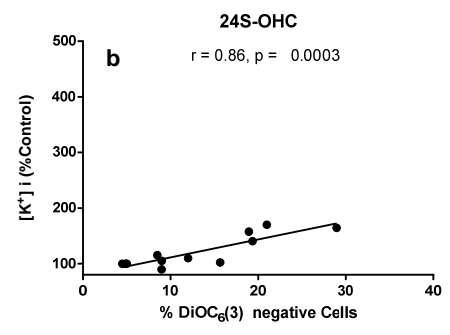
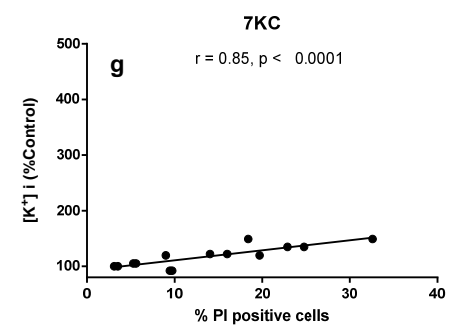
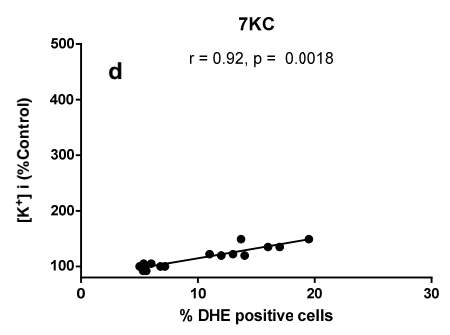
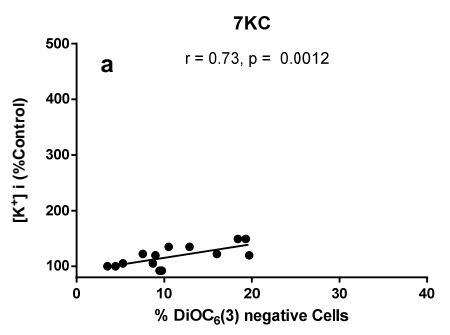
158N (24 h)



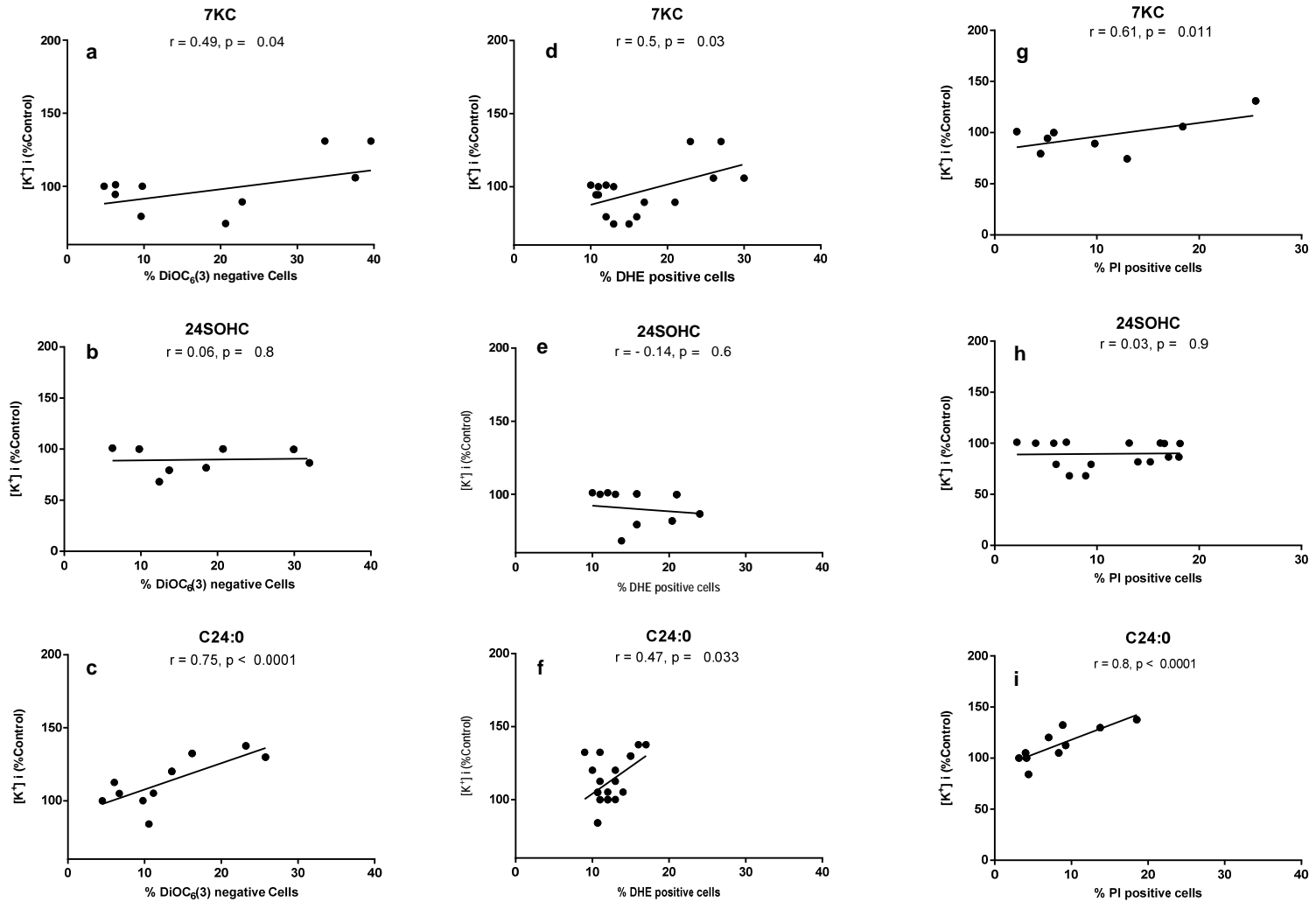
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

Bezine M et al., Supplementary Fig. 4

BV-2 (24 h)



BV-2 (48 h)



Bezine M et al., Supplementary Fig. 6

	% DiOC ₆ (3) negative cells	% DHE positive cells	% PI positive cells
Control	8.7 ± 0.9	8.1 ± 0.8	4.8 ± 1.8
EtOH (0.05%)	7.4 ± 0.3	8.5 ± 0.4	8.9 ± 2.6
EtOH (0.025%)	7.3 ± 1.4	8.2 ± 1.3	7.7 ± 1.1
EtOH (0.005%)	9.0 ± 1.6	8.3 ± 1.0	9.4 ± 0.4
7KC (2.5 μM)	23.6 ± 17 *	12.6 ± 2.9*	15.6 ± 0.8*
7KC (12.5 μM)	31.2 ± 2.6 *	26.5 ± 3.4*	20.9 ± 4.6*
7KC (25 μM)	36.0 ± 4.3*	42.7 ± 1.3 *	38.9 ± 5.4*
24S-OHC (2.5 μM)	18.5 ± 4.6*	24.0 ± 2.3*	23.7 ± 0.8*
24S-OHC (12.5 μM)	32.4 ± 3.9 *	33.9 ± 2.7*	31.6 ± 0.9*
24S-OHC (25 μM)	48.1 ± 1.0*	41.2 ± 1.5*	44.2 ± 1.2*
α-cyclodextrin (0.05 mM)	7.2 ± 0.6	7.3 ± 1.0	2.9 ± 0.2
α-cyclodextrin (0.25 mM)	6.7 ± 0.4	6.6 ± 0.5	2.5 ± 0.1
α-cyclodextrin (0.5 mM)	7.4 ± 0.8	7.1 ± 0.6	2.8 ± 0.2
α-cyclodextrin (1 mM)	8.4 ± 1.2	6.4 ± 0.1	3.2 ± 0.6
C24:0 (1 μM)	7.9 ± 0.7	7.8 ± 1.5	3.5 ± 0.7
C24:0 (5 μM)	18.9 ± 1.1*	7.9 ± 1.0	4.5 ± 0.2
C24:0 (10 μM)	10.5 ± 3.5*	13.2 ± 0.6*	11.2 ± 1.5*
C24:0 (20 μM)	21.7 ± 1.8*	18.7 ± 1.6 *	23.0 ± 2.6*

Supplementary Table 1: Percentage of DiOC₆(3)-negative cells, DHE- and PI-positive cells. 7KC, 24S-OHC and C24:0 – treated 158N cells, time of treatment 24 h. Data were analyzed with Tukey's range test. No significant difference was observed between untreated and vehicle-treated cells. *: P < 0.01 (significant difference between 7KC, 24S-OHC, C24:0 and the corresponding vehicle).

	% DiOC ₆ (3) negative cells	% DHE positive cells	% PI positive cells
Control	4.6 ± 1.6	6.4 ± 0.7	3.4 ± 0.2
EtOH (0.05 %)	5.6 ± 0.9	5.6 ± 0.6	5.3 ± 1.2
EtOH (0.025 %)	5.1 ± 1.3	6.3 ± 0.5	6.0 ± 1.0
EtOH (0.005 %)	3.8 ± 0.6	6.3 ± 1.2	4.9 ± 1.4
7 KC (2.5 μM)	8.3 ± 1.7	5.4 ± 0.1	8.7 ± 1.3
7 KC (12.5 μM)	12.6 ± 3.5 *	13.0 ± 0.8 *	13.5 ± 2.1 *
7 KC (25 μM)	15.3 ± 3.7 *	16.4 ± 1.3*	23.3 ± 2.4 *
24 S-OHC (2.5 μM)	8.7 ± 0.2	11 ± 1.1	5.9 ± 0.6
24 S-OHC (12.5 μM)	17.5 ± 1.8*	11.6 ± 0.5	10 ± 1.1 *
24 S-OHC (25 μM)	24 ± 4.1*	21.6 ± 6.3*	15.5 ± 0.3*
α-cyclodextrin (0.05 mM)	4.2 ± 0.3	5.6 ± 0.5	3.1 ± 0.6
α-cyclodextrin (0.25 mM)	4.0 ± 0.9	6.3 ± 0.4	3.7 ± 0.3
α-cyclodextrin (0.5 mM)	5.1 ± 0.7	5.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1
α-cyclodextrin (1 mM)	8.4 ± 0.9	6.9 ± 0.8	3.6 ± 0.3
C24:0 (1 μM)	8.9 ± 1.3	7.4 ± 1.1	3.4 ± 0.3
C24:0 (5 μM)	8.4 ± 0.9	8.3 ± 0.8	4.5 ± 0.8
C24:0 (10 μM)	9.8 ± 1.7	10 ± 0.8	7.9 ± 0.5
C24:0 (20 μM)	19.3 ± 1.6 *	12.3 ± 1.2 *	17.0 ± 2.1*

Supplementary Table 2: Percentage of DiOC₆(3) negative cells, DHE and PI positive cells. 7KC, 24S-OHC and C24:0 – treated BV-2 cells, time of treatment 24 h. Data were analysed with the Tukey's range test. No significant difference was observed between untreated and vehicle-treated cells. *: P < 0.01 (significant difference between 7KC, 24S-OHC, C24:0 and the corresponding vehicle).

	% DiOC ₆ (3) negative cells	% DHE positive cells	% PI positive cells
Control	6.8 ± 1.7	12.0 ± 0.8	3.9 ± 0.8
EtOH (0.05 %)	8.1 ± 1.3	12.4 ± 0.2	3.8 ± 1.6
EtOH (0.025 %)	7.6 ± 1.2	12.5 ± 0.5	2.9 ± 0.5
EtOH (0.005 %)	8.5 ± 0.3	14.3 ± 0.8	3.9 ± 1.4
7 KC (2.5 μM)	7.9 ± 1.7	12.9 ± 2.2	4.8 ± 0.3
7 KC (12.5 μM)	26.7 ± 3.4*	17.0 ± 3.1*	11.4 ± 1.5
7 KC (25 μM)	40.1 ± 3.2*	26.3 ± 2.8*	21.9 ± 1.6*
24S-OHC (2.5 μM)	13.6 ± 0.6	14.8 ± 1.0	8.5 ± 0.9
24S-OHC (12.5 μM)	19.6 ± 1.1*	18.1 ± 2.3*	14.8 ± 1.2*
24S-OHC (25 μM)	31.0 ± 1.0*	22.5 ± 1.5*	17.6 ± 0.7*
α-cyclodextrin (0.05 mM)	6.5 ± 0.8	7.3 ± 0.8	5.2 ± 1.0
α-cyclodextrin (0.25 mM)	6.6 ± 1.0	7.1 ± 1.6	5.5 ± 1.2
α-cyclodextrin (0.5 mM)	7.2 ± 1.2	8.1 ± 0.8	4.7 ± 0.6
α-cyclodextrin (1 mM)	6.7 ± 1.4	7.4 ± 0.7	5.4 ± 0.9
C24:0 (1 μM)	8.6 ± 1.9	10.7 ± 0.8	6.4 ± 1.9
C24:0 (5 μM)	8.7 ± 2.5	12 ± 0.8	6.6 ± 2.6
C24:0 (10 μM)	14.9 ± 1.3	13.7 ± 1.6*	7.9 ± 0.9
C24:0 (20 μM)	24.5 ± 1.2*	14.0 ± 1.1*	16.5 ± 2.3*

Supplementary Table 3: Percentage of DiOC₆(3) negative cells, DHE and PI positive cells. 7KC, 24S-OHC and C24:0 – treated BV-2 cells, time of treatment 48 h. Data were analysed with the Tukey's range test. No significant difference was observed between untreated and vehicle-treated cells. *: P < 0.01 (significant difference between 7KC, 24S-OHC, C24:0 and the corresponding vehicle).