

# NOVAQ10<sup>®</sup>

Distribution:

**PHAONA**

Kemp House - 152 City Road  
London EC1V 2NX - Greay-Britain  
Phone: +33 (0)6 83 16 60 78





# Composés hybrides w-alcanol / hydroquinone à activité neurotrophique. Synthèse et étude des propriétés physicochimiques et biologiques.

Mazen Hanbali

## ► To cite this version:

Mazen Hanbali. Composés hybrides w-alcanol / hydroquinone à activité neurotrophique. Synthèse et étude des propriétés physicochimiques et biologiques.. Autre. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, 2005. Français. <tel-00116946>

**HAL Id: tel-00116946**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00116946>**

Submitted on 28 Nov 2006

**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.

Thèse

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE  
STRASBOURG

Discipline : Chimie Organique

par

Mazen HANBALI

**Composés hybrides  $\omega$ -Alcanol / Hydroquinone à  
activité neurotrophique. Synthèse et étude des  
propriétés physicochimiques et biologiques.**

Soutenue le 17 Octobre 2005 devant la commission d'examen

Docteur	Francis SCHUBER	Rapporteur interne
Docteur	Bruno FIGADERE	Rapporteur externe
Professeur	Alain BURGER	Rapporteur externe
Professeur	Michel ROHMER	Examineur
Docteur	Dominique BAGNARD	Examineur
Docteur	Bang LUU	Directeur de thèse

## Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles sous la direction du Dr. Bang Luu. L'étude biologique a été, quant à elle réalisée au Laboratoire de Physiologie Moléculaire du Système Nerveux, sous la direction du Dr. Dominique Bagnard.

Au Docteur **Bang Luu**,

Je tiens à vous remercier très sincèrement de m'avoir accueilli dans votre équipe de recherche et de m'avoir donné la possibilité de travailler sur un sujet passionnant mêlant la chimie organique et la biologie du système nerveux. Merci aussi pour la liberté d'initiatives que vous m'avez laissée ainsi que pour vos nombreux encouragements.

Au Docteur **Dominique Bagnard**,

Merci beaucoup de m'avoir appris la biologie expérimentale. Ta passion pour le sujet et ta bonne humeur ont rendu ces trois années de thèse très agréables et m'ont permis de réapprendre à aimer une matière que j'avais un peu quittée.

Aux Professeurs **Michel Rohmer** et **Alain Brger** ainsi qu'aux Docteurs **Francis Schuber** et **Bruno Figadère**,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce mémoire, conscient du travail que cela représente.

Un grand merci au Dr. **Richard Sedrani** qui, malgré sa bonne volonté et ses efforts pour juger ce travail de thèse, n'a pu faire parti du jury d'examen.

Aux Docteurs **Elisabeth Trifilieff**, **Laurent Désaubry** et **Catherine Grosdemange** pour les discussions, aussi bien scientifiques que générales, les conseils enrichissants et la bonne humeur générale. Un chaleureux merci à Laurent pour m'avoir aidé à trouver un post-doc de qualité.

Au Docteur **Djalil Coowar** pour avoir initié un petit biologiste de formation, à la chimie organique expérimentale. Merci d'avoir été un ami aussi bien qu'un collaborateur.

A **Thierry** qui a représenté énormément pour moi. Sa bonne humeur continuelle, sa passion pour les petites choses de la vie et son amitié sans faille ont fait de lui un ami très cher, un frère, qui me manquera énormément.

A **Nadège** et **Frédérique**, les deux éternelles DEA du labo. Non seulement pour avoir corrigé mes fautes d'orthographe et de français dans ce manuscrit, mais aussi pour les moments partagés !  
Vive les mojitos !

A **Catherine** et **Ludivine**, les deux plus jeunes du laboratoire qui ont fait aveuglément confiance à mes discours scientifiques ou autres, et qui sont devenues de bonnes amies.

A **Ronan**, **Odile**, **Nigel**, **Lionel**, **Mari**, **Olivier**, **Régis**, **Karim**, **Turibio**, **Jawei**, **Bertrand**, **Lise**, **Eric**, **Michael**, **Martine**, **Claire** et j'en oublie certainement... pour les bons moments passés ensemble ! Ces trois dernières années ont été une partie de plaisir grâce à vous.

A **Sarah**, pour avoir été plus qu'une confidente, une très bonne amie qui a partagé toutes mes peines et mes joies. Thank you, baby!

A **Thomas-François** et **Jean-Philippe**, les deux manouches, qui sont passés outre la différence d'âge et qui sont devenus de très bons amis. Merci pour les moments partagés et bien plus encore... Ne changez surtout pas !

A **Lydia**, avec qui j'ai partagé neuf années d'études. Dans la difficulté, la plaisanterie, les examens interminables, les défaites et les joies, nous avons su rester amis et partager encore beaucoup.

A **Olivier**, **Thalia**, **Corine** et **Catherine**, mes quatre amis les plus chers. Merci d'avoir été présents pendant plus de 5 ans. D'avoir subi mes hauts et mes bas sans jugement, d'avoir passé autant de temps avec moi et d'être devenus les quatre personnes qui me manqueront de loin le plus.

A mes sœurs **Didi** et **Biba**, mon frère **Maher** et ma nièce **Federica**, qui m'aiment.

Finalement, à tous ceux que j'ai connus, pendant ces 9 dernières années à Strasbourg et qui ont compté pour moi, mais que la vie a éloignée.

# Sommaire

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
<b>I. LE SYSTEME NERVEUX, LES FACTEURS NEUROTROPHIQUES ET LES MALADIES NEURODEGENERATIVES</b>	<b>2</b>
A. Le Système Nerveux	2
1. Les cellules du SNC	2
a. Les neurones	2
b. Les cellules gliales	2
i. Les astrocytes	3
ii. Les oligodendrocytes	4
iii. Les cellules microgliales	4
iv. Les cellules épendymaires	5
v. Les cellules souches neurales	5
B. Les maladies neurodégénératives et leur traitement	5
1. La maladie d'Alzheimer	5
a. Lésions histologiques	6
b. Implication des phénomènes inflammatoires et immunologiques	6
c. Les stratégies thérapeutiques	7
i. Inhibiteurs de l'acétylcholine estérase	7
ii. Inhibition de la formation de la protéine A $\beta$	8
iii. Anti-inflammatoires et immunosuppresseurs	8
2. La Sclérose Latérale Amyotrophique (ALS)	8
a. Les formes cliniques de la maladie	9
b. Les mécanismes de la maladie	9
i. L'hypothèse excitotoxique	9
ii. Hypothèse génétique et stress oxydant	10
iii. D'autres mécanismes	10
c. Les stratégies thérapeutiques	10
i. Composés anti-glutamate	10
ii. Molécules neurotrophiques	11
C. Les facteurs neurotrophiques comme agents thérapeutiques	12
1. Les facteurs neurotrophiques naturels	12
2. Les facteurs neurotrophiques de substitution	13
a. Exemples de la littérature de molécules neurotrophiques	13
b. Les alcools à longue chaîne hydrocarbonée	15
c. Les alcools gras cyclohexénoniques	15

D. Maladies neurodégénératives et atteintes axonales	16
1. Généralités	16
2. Réponse gliale	17
3. Atteintes axonales	17
<b>II. CICATRISATION GLIALE ET REGENERATION NERVEUSE</b>	17
A. La croissance axonale	17
1. Dynamique moléculaire du cône de croissance	18
2. Facteurs protéiques régulant la dynamique du cytosquelette	19
B. La cicatrisation gliale	20
1. Mise en place de la cicatrisation gliale	20
2. Les acteurs cellulaires	20
C. Les cellules inhibitrices de la croissance axonale	21
1. Les astrocytes	21
2. Les oligodendrocytes	22
3. Les précurseurs d'oligodendrocytes	22
4. La microglie	22
5. Les cellules des méninges	23
D. Les molécules inhibitrices de la croissance axonale	23
1. Les protéines associées à la myéline	23
a. Nogo	24
b. MAG	24
c. OMgp	24
d. Tenascine R	25
2. Les chondroïtines sulfates protéoglycanes	25
3. Les Sémaphorines	25
E. Etude détaillée de l'effet inhibiteur des protéines de myéline et de la Sema3A	27
1. Les protéines de myéline	27
a. Structure des protéines de myéline	27
b. Récepteur et co-récepteur de NogoA, OMgp et MAG	27
c. La signalisation intracellulaire et la réponse cellulaire	28
2. La Sema3A	29
a. Structure de la Sema3A	29
b. Récepteur et co-récepteur de la Sema3A	30
c. Voie de signalisation intracellulaire et réponse cellulaire	31
i. Phosphorylation du complexe récepteur sur une tyrosine	31
ii. Implication de la Cofiline	32
iii. Implication des protéines Rho	32

<b>III. QUINONES : DE PUISSANTS ANTIOXYDANTS. PROPRIETES BIOLOGIQUES ET PHYSICOCHIMIQUES</b>	32
A. Répartition des quinones dans le monde vivant	32
B. Biosynthèse des quinones animales	33
C. Rôle biologique des quinones (quelques exemples)	34
1. Production d'énergie cellulaire	34
2. Acidification des lysosomes	35
D. Rôle physicochimique des quinones	35
1. L'ubiquinone existe sous différentes formes selon son état d'oxydation	35
2. Activité antioxydante de l'ubiquinol et de l'ubiquinone	36
3. Activité pro-oxydante des formes UQH <sup>•</sup> /UQH/UQ <sup>•-</sup>	36
4. L'activité antioxydante de l'ubiquinol est jumellée à celle de l' $\alpha$ -tocophérol	37
5. Effet de la chaîne hydrophobe sur le pouvoir antioxydant	37
E. Quinones, SNC et maladies neurodégénératives	39
1. Constatations expérimentales	39
2. Maladies neurodégénératives et coenzyme Q <sub>10</sub>	39
a. Maladie de Parkinson	39
i. Caractéristiques cliniques	39
ii. Causes de la maladie	40
iii. Rôle du coenzyme Q <sub>10</sub>	40
b. Maladie de Huntington	41
i. Caractéristiques cliniques	41
ii. Causes de la maladie	41
iii. Rôle du coenzyme Q <sub>10</sub>	41
c. Sclérose Latérale Amyotrophique (ALS)	41
i. Caractéristiques cliniques	41
ii. Causes de la maladie	41
iii. Rôle du coenzyme Q <sub>10</sub>	42
<b>IV. CADRE DU TRAVAIL</b>	42
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	44



## Chapitre I : Synthèse et étude du tCFA15

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION</b>	49
<b>II.</b>	<b>PUBLICATION : « Counteraction of axonal growth inhibitory properties of Semaphorin 3A and myelin-associated proteins by a synthetic neurotrophic compound »</b>	50
<b>III.</b>	<b>SYNTHESE CHIMIQUE DU tCFA15</b>	51
	A. Synthèse de la chaîne latérale $\omega$ -alcanol	51
	B. Synthèse du cycle cyclohexénonique triméthylé	51
	C. Couplage et obtention du tCFA15	52
<b>IV.</b>	<b>PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DU tCFA15</b>	52
	A. Test au DPPH	52
	1. Principe du test	52
	2. Résultats concernant le tCFA15	53
	B. Test à l'ABTS	53
	1. Principe du test	53
	2. Résultats concernant le tCFA15	54
	C. Incorporation du tCFA15 dans les vésicules multilamellaires de DPPC	54
	1. Principe du test	54
	2. Résultats sur le tCFA15	55
<b>V.</b>	<b>PROPRIETES BIOLOGIQUES DU tCFA15</b>	56
	A. Le tCFA15 peut stimuler la croissance axonale sur milieu inhibiteur	56
	B. Cascade intracellulaire cible du tCFA15	57
	1. Inhibition de multiples voies internes	57
	2. Effet sur la phosphorylation de Cdk-5	57
	3. Inhibition monooxygénase flavoprotéines	57
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSION</b>	57
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	58

## Chapitre II : Synthèse des alcools gras quinoliques

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION</b>	59
<b>II.</b>	<b>SYNTHESE DES QFA C-ALKYLES</b>	60
	A. Rappels bibliographiques	60
	1. Le noyau quinolique nucléophile	60
	a. Couplage en milieu acide	60
	b. Couplage en milieu basique	61
	c. Autres méthodes	61
	2. Le noyau quinol électrophile	62
	3. Couplage exocyclique sur le noyau quinol	63
	a. Réaction de condensation	63
	b. Réaction de Wittig/Wadsworth-Emmons	64
	c. Couplage catalysé au Ni <sup>0</sup>	65
	4. Couplage via la chimie de palladium et du fer	65
	a. Chimie du fer	65
	b. Chimie du palladium	66
	i. Couplage de Heck	66
	ii. Couplage de Negishi	66
	iii. Couplage de Suzuki	67
	iv. Couplage de Sonogashira	67
	B. Synthèse choisie	68
	1. Couplage direct	68
	2. Couplage de Negishi	69
	3. Couplage de Suzuki	69
	4. Couplage de Sonogashira	70
	C. Synthèse des QFA	72
	1. Synthèse des arylbromures	72
	a. Synthèse des dérivés di- et tri- méthoxylés	72
	b. Synthèse des dérivés tétraméthoxylés	73
	2. Synthèse des alcynes vrais ω-benzyloxylés	73
	a. Synthèse des ω-bromoalcanols	73
	b. Synthèse des alcynes vrais ω-benzyloxylés	74
	3. Couplage et hydrogénation	74
	4. Récapitulatif	75

<b>III.</b>	<b>SYNTHESE DES QFA N/O-ALKYLES</b>	75
	A. Rappels bibliographiques	76
	1. N-alkylation d'anilines	76
	2. O-alkylation de phénols	77
	B. Synthèse des QFA N-alkylés	79
	1. Sélection de la voie synthétique	79
	2. Synthèse des bromoalcools $\omega$ -silyloxylés	79
	3. Couplage et déprotection	80
	C. Synthèse des QFA O-alkylés	80
	1. Synthèse du 2,5-diméthoxyphénol	80
	2. Synthèse des O-QFA	80

<b>IV.</b>	<b>CONCLUSION</b>	81
------------	-------------------	----

	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	82
--	------------------------------------	----

### **Chapitre III : Etude biologique**

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION</b>	85
<b>II.</b>	<b>CAPACITE ANTIOXYDANTE DES QFA</b>	85
	A. Déméthylation des QFA	85
	B. Tests d'antioxydation	87
	C. Conclusion	89
<b>III.</b>	<b>EFFET DES QFA SUR LA CROISSANCE NEURITIQUE</b>	90
	A. Test biologique effectué	90
	B. Screening de la bibliothèque des QFA	90
	C. Activité du QFA15 sur les neurones	92
	1. Effet dose dépendant du QFA15	92
	2. QFA15 et inhibition axonale	93
	3. Voie intracellulaire sollicitée	95
	a. Tests biologiques effectuées	95
	b. Rôle des nucléotides cycliques dans la croissance et la régénération nerveuse	96
	c. Récapitulatif	97
<b>IV.</b>	<b>DISCUSSION</b>	98

<b>V. CONCLUSION</b>	99
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	100

## **Chapitre IV : Synthèses supportées**

<b>I. INTRODUCTION</b>	101
<b>II. SYNTHESE SUPPORTEE DES QFA C-ALKYLES</b>	102
A. Rappels bibliographiques	102
B. Synthèse des QFA C-alkylés	104
1. Schéma rétrosynthétique	104
2. Synthèse de l'alcyne vrai supporté	105
a. Résine en tant que nucléophile	105
b. Réaction de Mitsunobu	105
c. Résine en tant qu'électrophile	106
3. Synthèse	107
4. Récapitulatif	108
<b>III. SYNTHESE D'UN DERIVE ACIDE HYDROXAMIQUE</b>	108
A. Propriétés biologiques des acides hydroxamiques	108
B. Rappels bibliographiques	111
C. Synthèse effectuée	112
1. Oxydation de l'alcool primaire	112
a. Oxydation en une étape	113
b. Oxydation en deux étapes	113
2. Synthèse de la résine hydroxylamine	114
3. Couplage – Coupure	115
<b>IV. CONCLUSION</b>	115
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	116

## **Conclusion et perspectives**

<b>I. SYNTHESE ORGANIQUE</b>	118
------------------------------	-----

**II. ETUDE PHYSICOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE** 119

**III. PERSPECTIVES** 120

### **Partie expérimentale**

**I. Synthèse des QFA C-alkylés** 124

**II. Synthèse des QFA N/O-alkylés** 149

**III. Synthèse supportée** 158

**IV. Analyses physicochimiques et biologiques** 167

### **Communications scientifiques**

## ABREVIATIONS, ACRONYMES, SYMBOLES ET NOMS TRIVIAUX

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Sérum albumine bovine
Coll.	Collaborateurs
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DEAD	Diéthyl azodicarboxylate
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité Optique
EDC	1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide
éq.	Equivalent
GTP	Guanosine triphosphate
Ig	Immunoglobuline
Imid.	Imidazole
J	Constante de couplage
kDa	Kilo Dalton
mCPBA	Acide méta-chloroperbenzoïque
MHz	Méga hertz
mL	Mili litre
mM	Mili molaire
mm	Mili mètre
mmol	Mili mole
mol	Mole
N	Normal
NBS	N-bromosuccinimide
ng	Nano gramme
nM	Nano molaire
nm	Nano mètre
NMO	N-méthylmorpholine N-oxyde
PBS	Tampon Phosphate
PCC	Pyridinium chlorochromate
Pd/C	Palladium sur charbon
PDC	Pyridinium dichromate

PFA	Paraformaldéhyde
pM	Pico molaire
PM	Poids Moléculaire
ppm	Parties par millions
PV-PDV	Poly vinyl-pyridinium dichromate
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SEM	Ecart par rapport à la moyenne
SN2	Substitution Nucléophile d'ordre 2
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
t.a.	Température ambiante
T°	Température
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBDMS	<i>Tert</i> -butyldiméthysylile
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TMG	1,1,3,3-tétraméthylguanidine
TPAP	Tétrapropylammonium perrhuténate
trk	Tyrosine kinase
v	Volume
$\Delta$	Reflux
$\delta$	Déplacement chimique
$\mu$	Moment dipolaire
$\mu\text{g}$	Micro gramme
$\mu\text{L}$	Micro litre
$\mu\text{M}$	Micro molaire
$\mu\text{m}$	Micro mètre

# Introduction générale



## INTRODUCTION GENERALE

Depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle, l'espérance de vie dans les pays développés est en constante augmentation, passant de 41 à 70 ans. Ce gain est dû à la baisse de la mortalité infantile mais également à l'allongement de l'espérance de vie grâce aux progrès de la médecine et de l'hygiène de vie.

Ce phénomène entraîne alors un vieillissement de la population qui va de pair avec l'apparition de pathologies liées à l'âge telles que :

- les accidents vasculaires (maladies cardio-vasculaires et cérébro-vasculaires)
- les maladies du système locomoteur (ostéoporose et maladies dégénératives articulaires)
- les cancers
- les neuropathies dégénératives (maladie d'Alzheimer et de Parkinson, sclérose en plaque)

Un des thèmes principaux du laboratoire concerne les maladies neurodégénératives se caractérisant par une perte progressive et irréversible d'une partie des cellules du système nerveux. Notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement à la conception et à la synthèse d'agents thérapeutiques potentiels permettant de comprendre les phénomènes qui génèrent cette mort neurale ainsi qu'au développement de traitements pour ces neuropathies dégénératives.

Un point commun, caractéristique de toutes ces neuropathies, est l'atteinte axonale des neurones concernés. En effet, toute atteinte axonale, accidentelle ou liée à une maladie, va de pair avec l'apparition d'une zone de cicatrisation qui rend la régénération très difficile.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la régénération des neurones en présence de substrats non permissifs, et ce par l'étude de leur prolongement principale, l'axone.

## I. LE SYSTEME NERVEUX, LES FACTEURS NEUROTROPHIQUES ET LES MALADIES NEURODEGENERATIVES

### A. Le Système Nerveux

Le système nerveux humain est responsable de l'émission, de la réception et du traitement de l'influx nerveux. Il contrôle les actions et sensations de toutes les parties du corps ainsi que la pensée, les émotions et la mémoire.

Il se divise en deux parties bien distinctes :

- **le système nerveux central (SNC)** : encéphale (cerveau, cervelet, tronc cérébral) et moelle épinière. Il est responsable de l'intégration des messages reçus de toutes les régions de l'organisme,
- **le système nerveux périphérique (SNP)** : ensemble des nerfs rattachés au système nerveux central. Son rôle est de véhiculer les signaux générés par les stimuli externes vers le SNC, puis véhiculer la réponse aux stimuli vers les effecteurs.

#### 1. Les cellules du SNC

Le SNC est constitué en grande partie des neurones, cellules qui assurent les relations de l'organisme avec les milieux externes et internes. En fonction des informations reçues, ils élaborent des réponses motrices ou sensorielles.

Les cellules gliales, quant à elles, sont essentielles au SNC de par leur fonction d'isolant, de protection et d'apport nutritionnel.

##### a. Les neurones

Les neurones, qui constituent 10 à 20% des cellules cérébrales, sont des cellules hautement spécialisées dans la réception, le traitement et la transmission de l'influx nerveux. Chez l'adulte, ces cellules sont post-mitotiques, et ne se divisent donc pas. Un neurone est constitué de trois parties bien distinctes :

- *le soma* : appelé aussi corps cellulaire, il contient le noyau et les organites cellulaires traditionnels. Il assure la synthèse des composés nécessaires au bon fonctionnement de la cellule entière. De plus, il est capable de par ses propriétés électriques particulières d'assurer l'intégration de plusieurs influx nerveux post-synaptiques pour en faire une seule réponse électrique.
- *l'axone* : il s'agit du prolongement le plus long du neurone. Il est commencé par un « cône d'émergence » où sont générés les signaux électriques à conduction

centrifuge. Constitué essentiellement de protéines du cytosquelette (microfilaments d'actine, filaments intermédiaires et microtubules), il assure aussi le transport de vésicules vers les boutons terminaux trouvés à son extrémité.

- *Les dendrites* : différents de l'axone de par leur longueur plus modeste et leur forme en arborescence, ils sont responsables de la conduction centripète du signal nerveux.

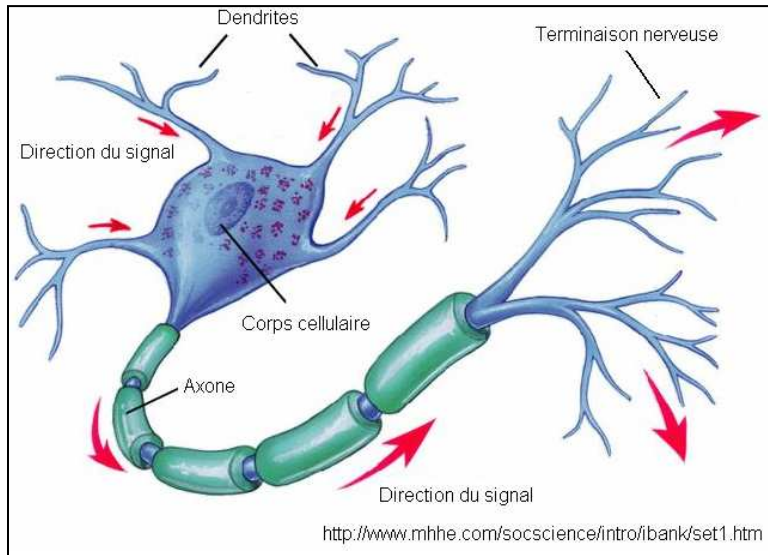


Fig. 1 : représentation schématique d'un neurone

## b. Les cellules gliales

Les cellules gliales, longtemps considérées comme de simples cellules de soutien, exercent en réalité un rôle beaucoup plus étendu. Elles interagissent avec les neurones et assurent la bonne transmission du signal nerveux et donc le bon fonctionnement de tout le tissu nerveux.

### i. Les astrocytes

Ils sont composés d'un corps cellulaire contenant le noyau et de nombreux prolongements diversement ramifiés. Ils constituent l'architecture cérébrale au cours du développement ainsi que la plasticité des synapses interneuronales. Il s'agit des acteurs principaux de la constitution de la barrière hémato-encéphalique. De plus, ils constituent le seul lieu de stockage du glucose dans le SNC. Les facteurs de croissance qu'ils sécrètent sont essentiels à la conservation des fonctions neurales ainsi qu'à la survie cellulaire.

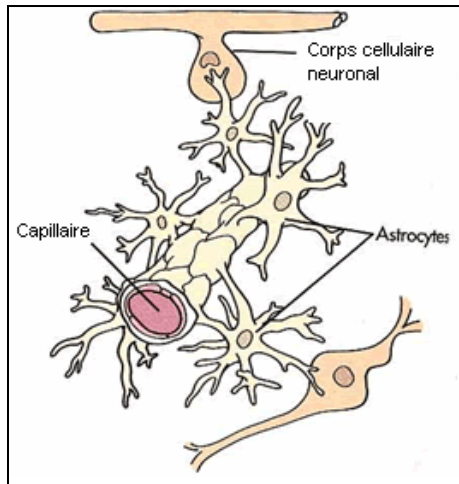


Fig. 2 : Représentation schématique d'un astrocyte (<http://learntech.uwe.ac.uk/radiography/RAnatomy/nervous/nervous7.htm>)

### ii. Les oligodendrocytes

De petite taille, ces cellules émettent des prolongements cytoplasmiques qui s'enroulent autour des axones, constituant ainsi des enveloppes isolantes appelées « gaines de myéline ». Cet isolant permet une accélération de la conduction du signal nerveux.

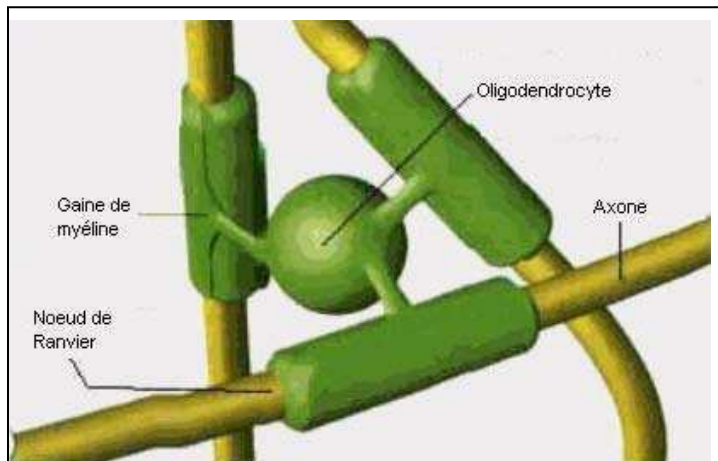


Fig. 3 : représentation schématique d'un oligodendrocyte avec ses prolongements en gaine de myéline. Les étranglements de la gaine de myéline s'appellent « Nœuds de Ranvier ». (<http://www.jdaross.cwc.net/intronerv2.htm>)

### iii. Les cellules microgliales

Elles possèdent les caractéristiques morphologiques et immunologiques des monocytes-macrophages. Les microgliaocytes jouent un rôle essentiel au cours des réponses inflammatoires et immunitaires du SNC. Les cellules microgliales activées sécrètent des radicaux libres, des protéases ainsi que des cytokines impliqués dans les phénomènes inflammatoires.

iv. Les cellules épendymaires

Elles tapissent les formations ventriculaires. Elles sécrètent le liquide céphalorachidien et sont susceptibles de jouer un rôle lors de la migration de certaines cellules au cours du développement du système nerveux.

v. Les cellules souches neurales

Les cellules souches neurales sont des cellules multipotentes du système nerveux. Elles sont capables de se différencier en neurones fonctionnels et en cellules gliales. Le rôle des cellules souches dans le cerveau est d'intervenir dans le développement de la mémoire et d'aider à la reconstitution des tissus lésés. Leur nombre est très limité.

## **B. Les maladies neurodégénératives et leur traitement**

Les neuropathies dégénératives font partie des pathologies du système nerveux. Elles sont caractérisées par une dégénérescence progressive, puis par la mort de certaines catégories ou sous-populations de neurones ou de cellules gliales.

La majorité de ces neuropathies dégénératives sont directement associées au vieillissement du système nerveux, plus rares sont celles liées à l'action d'agents viraux ou aux formes pathogènes de la protéine du prion comme la maladie de Creutzfeld-Jacob.

Ces maladies dégénératives peuvent être classées en deux catégories :

- Les pathologies provoquant des démences séniles et/ou des troubles moteurs comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou la chorée de Huntington.
- Les maladies neurologiques entraînant des paralysies comme la sclérose latérale amyotrophique ou la sclérose en plaques.

Nous allons détailler plus particulièrement deux neuropathies dégénératives : la maladie d'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique.

### 1. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui affecte, en général, les personnes âgées de plus de 80 ans. Elle se manifeste par une perte irréversible de la mémoire, une diminution des facultés de jugement et un changement du comportement<sup>1</sup>. La maladie d'Alzheimer existe sous deux formes : la forme sporadique, la plus courante, et une forme familiale autosomique dominante.

a. Les lésions histologiques

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par deux modifications histologiques majeures : la production d'amyloïde et la formation neurofibrillaire. Ces modifications histologiques entraînent la mort des cellules nerveuses impliquées dans le processus de la mémoire ainsi que dans les fonctions gestuelles et intellectuelles situées principalement dans le cortex cérébral et l'hippocampe.

- Les plaques séniles sont des dépôts extracellulaires constitués principalement de la protéine **amyloïde bêta (A $\beta$ )**, mais également de cofacteurs comme l'apolipoprotéine E et les protéoglycanes, ainsi que de cellules inflammatoires<sup>2</sup>. La protéine A $\beta$  provient du clivage d'une glycoprotéine transmembranaire « **amyloid precursor protein (APP)** ».

Son clivage par la  $\beta$ -sécrétase conduit au peptide A $\beta$  présent lors du processus normal de vieillissement du système nerveux. Lors de la maladie d'Alzheimer, la concentration de peptide A $\beta$  est cependant plus importante.

- Les dégénérescences neurofibrillaires sont des lésions intraneurales provoquées par l'accumulation de fibrilles constituées de microtubules et de protéines Tau hyperphosphorylées<sup>3</sup> responsables de la stabilisation des microtubules. Cette accumulation conduit à une mort neuronale.

b. Implication des phénomènes inflammatoires et immunitaires

Parmi les nombreuses hypothèses soulevées à propos de l'origine de la maladie d'Alzheimer, le rôle possible joué par des agents infectieux combinés à des changements du système immunitaire est souvent discuté<sup>4</sup>.

Les réponses immunes et inflammatoires jouent un rôle considérable dans l'évolution de la maladie d'Alzheimer<sup>5</sup>. Les cellules microgliales et les astrocytes activés par des anomalies ou des lésions s'accumulent autour des plaques séniles en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et des radicaux libres en générant une inflammation chronique autour des plaques d'A $\beta$ <sup>6</sup>.

Les microglies activées sécrètent la protéine pro-inflammatoire interleukine-1 (IL-1) qui active la synthèse de l'APP. Sa production en excès pourrait dévier son métabolisme vers l'A $\beta$  en saturant l' $\alpha$ -sécrétase, enzyme normalement chargée de sa métabolisation.

Les cellules gliales activées sécrètent également des radicaux libres qui seraient impliqués dans l'agrégation de l'A $\beta$  via l'augmentation excessive de l'oxydation protéique.

A ce jour, il n'est pas certain que la maladie d'Alzheimer soit causée par un phénomène inflammatoire. Il est cependant incontestable que les réponses immunes et inflammatoires du système nerveux aux plaques séniles contribuent de façon décisive à l'évolution néfaste de la maladie.

c. Les stratégies thérapeutiques

Il n'existe actuellement pas de traitement curatif pour la maladie d'Alzheimer. Les médicaments disponibles permettent uniquement un traitement symptomatique en retardant l'aggravation des troubles cognitifs.

i. Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Les lésions cérébrales sont souvent accompagnées d'une perturbation de la neurotransmission. La dégénérescence des dendrites et des neurones au cours de la maladie va de pair avec une baisse importante de la concentration de l'**acétylcholine**.

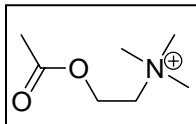


Fig. 4 : Acétylcholine

L'acétylcholine, neurotransmetteur étroitement lié aux facultés de mémoire, d'apprentissage et de raisonnement, subit une baisse importante (60 à 90%) au cours de la maladie (schéma 5). Cette déplétion cérébrale en acétylcholine est à l'origine de plusieurs voies de recherches thérapeutiques.

La stratégie thérapeutique consiste à utiliser des molécules bloquant l'activité de l'enzyme dégradant l'acétylcholine, l'acétylcholinestérase, compensant ainsi le déficit de ce neurotransmetteur. Trois inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (**Tacrine**, **Donézépil**<sup>7</sup> **Rivastigmine**<sup>8</sup>) (fig. 5) sont actuellement commercialisés en France.

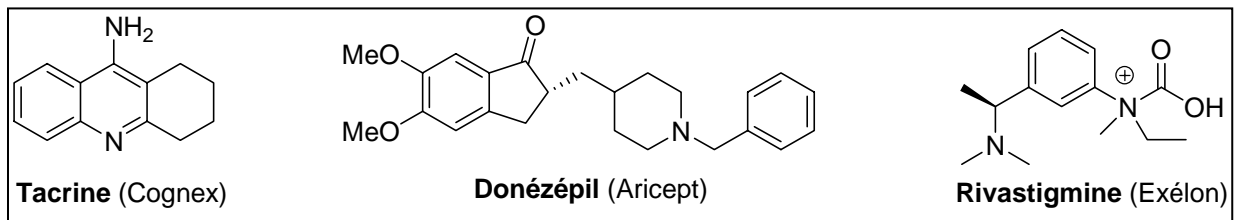


Fig. 5 : Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Ces composés retardent la progression de la maladie et améliorent la sémiologie, mais n'arrêtent pas le processus de dégénérescence. De plus, ils possèdent des effets secondaires assez prononcés : hépato-toxicité, effet sédatif, nausées et douleurs musculaires.

ii. Inhibition de la formation de la protéine A $\beta$ 

Les plaques séniles formées en grande partie par la protéine A $\beta$ , font partie des plus importantes modifications histologiques au cours de la maladie. Des inhibiteurs de sécrétases, les enzymes responsables de la dégradation de l'APP, sont actuellement en cours d'évaluation. Parmi ces composés se trouvent des inhibiteurs sélectifs de la  $\beta$ -sécrétase (**Balfilomycin A**) et de la  $\gamma$ -sécrétase (**DAPT**)<sup>9,10</sup>, enzymes produisant l'amyloïde bêta par clivage de l'APP (fig. 6).

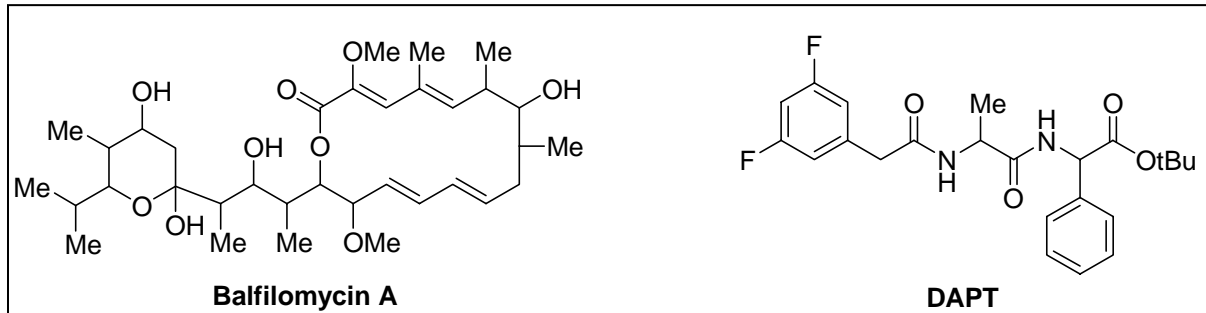


Fig. 6 : Inhibiteurs sélectifs de sécrétases

D'autres approches thérapeutiques dont le but est de traiter les troubles cognitifs de la maladie d'Alzheimer sont également entreprises. Des études concernant des inhibiteurs de la phosphorylation de la protéine Tau sont actuellement en cours. Beaucoup de moyens sont également déployés pour la recherche de composés neuroprotecteurs. Les principales cibles dans ce domaine sont la perturbation de l'homéostasie calcique cellulaire, la peroxydation lipidique et l'induction de l'apoptose.

## iii. Anti-inflammatoires et immunosuppresseurs

Des études épidémiologiques ont montré un effet protecteur des anti-inflammatoires et d'immunosuppresseurs contre la survenue de la maladie d'Alzheimer. Leur utilisation en thérapie a cependant été décevante. Ils sont capables de retarder les symptômes en début de maladie, mais perdent toute efficacité au cours de l'évolution de la maladie.

## 2. La Sclérose Latérale Amyotrophique (ALS)

La sclérose latérale amyotrophique (ALS), connue aussi sous le nom de « maladie de Charcot », est due à une neurodégénérescence progressive, impliquant les motoneurons du tronc cérébral et de la moelle épinière<sup>11</sup>. Cette maladie est caractérisée par une faiblesse musculaire progressive jusqu'à la mort, résultant d'une insuffisance respiratoire trois à cinq ans après l'apparition des symptômes. L'ALS peut être sporadique dans 90% des cas, ou



familiale dans 10% des cas. La moyenne d'âge des malades est de 59 ans et son incidence est de 1 à 3 pour 100000 habitants.

Même si de nos jours l'ALS est fatale, deux avancées majeures ont ouvert de nouvelles perspectives pour le traitement et la gestion de la maladie. Premièrement, il a été montré que 20% des patients souffrant de la forme familiale présentent des mutations de l'enzyme anti-oxydante superoxyde dismutase (SOD1)<sup>12</sup>. Deuxièmement, la molécule anti-glutamate **Riluzole** permet d'allonger la durée de vie des patients.

a. Les formes cliniques de la maladie

La maladie se caractérise par l'installation progressive d'une paralysie touchant de manière variable les membres inférieurs ou les membres supérieurs dans la forme spinale ainsi que la parole, la déglutition et la respiration dans la forme bulbaire. La forme spinale est communément trouvée chez les hommes d'âge moyen. La forme bulbaire touche généralement les femmes, et les premiers symptômes sont une difficulté à parler ou à avaler et une hypersialorrhée (augmentation de la quantité de salive).

b. Les mécanismes de la maladie

Bien que les informations accumulées sur la maladie aient conduit à différentes hypothèses sur les mécanismes possibles, il n'est toujours pas établi si les anomalies biochimiques ou physiologiques observées *post-mortem* sont les causes ou les conséquences de la maladie. Les mécanismes proposés sont les suivants :

i. L'hypothèse excitotoxique

La forte concentration synaptique du glutamate, acide aminé exciteur le plus important du système nerveux, résulte en une dépolarisation prolongée des neurones. Une augmentation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  provoque des dommages mitochondriaux suivis d'une mort apoptotique des neurones<sup>13</sup>. Dans l'ALS, il y a des signes montrant qu'une défection de la recapture du glutamate conduirait à une augmentation du taux de glutamate extracellulaire avec des conséquences délétères<sup>14</sup>. Cette excitotoxicité interviendrait par une activation des récepteurs AMPA glutamatergiques dépendant du  $Ca^{2+}$ . Une anomalie des transporteurs glutamatergiques sur les cellules gliales, EAAT2 (astroglial-specific excitatory amino-acid transporter), dans le cortex moteur et la moelle épinière serait responsable de l'accumulation extracellulaire du glutamate.

ii. L'hypothèse génétique et stress oxydant

La première indication, associée à l'ALS familiale, est une mutation du gène de l'enzyme cytoplasmique SOD1 dont le gène est situé sur le chromosome 21<sup>13</sup>. La SOD1 est un homodimère complexant un cation de cuivre et de zinc. Il protège les cellules contre des dommages oxydants en convertissant le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

Une mutation de la SOD1 entraîne une baisse de son activité antioxydante. Cette baisse d'activité enzymatique conduirait à une accumulation de radicaux superoxydes, toxiques pour les cellules. Même s'il n'est pas établi formellement que les fonctions de la SOD1 soient altérées pour une majorité des patients atteints de l'ALS, les symptômes cliniques sont assez similaires dans les formes familiale et sporadique de la maladie, ce qui indique clairement une toxicité liée au stress oxydant.

iii. D'autres mécanismes

L'éventualité que d'autres mécanismes puissent jouer un rôle dans la dégénérescence des motoneurones dans l'ALS est de plus en plus évidente. Ces mécanismes peuvent impliquer la mort programmée des motoneurones par apoptose<sup>15</sup>, des anomalies immunologiques provoquant des processus inflammatoires<sup>16</sup>, ou la dérégulation de l'expression des facteurs de croissance.

c. Les stratégies thérapeutiques

Plusieurs stratégies ont été étudiées en phase clinique pour l'ALS. Actuellement, le seul médicament mis sur le marché, et qui a démontré son efficacité clinique est le **Riluzole** (Rilutek®)<sup>17</sup>. Malheureusement, ce médicament engendre quelques effets secondaires (fatigue, nausée, maux de tête). Plusieurs autres molécules en cours de développement sont très prometteuses.

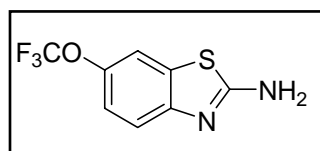


Fig. 7 : Riluzole (Rilutek®)

i. Composés anti-glutamate

Le **Topiramate** (Epitomax®), couramment utilisé dans le traitement de l'épilepsie, et des dérivés du **Dextromethorphan**, en cours d'études, semblent pouvoir abaisser le taux de glutamate dans le cerveau. Cependant l'efficacité clinique du dextromethorphan<sup>18</sup> est limitée

par sa métabolisation trop rapide *in vivo*. Plusieurs dérivés plus stables sont étudiés pour leur efficacité sur les patients atteints par l'ALS. De même, des inhibiteurs de la NAALADase (*N*-acetylated- $\alpha$ -linked acidic dipeptidase) responsable de l'hydrolyse du *N*-acétylaspartylglutamate en *N*-acétylaspartate et glutamate, sont en cours de développement préclinique<sup>19</sup>.

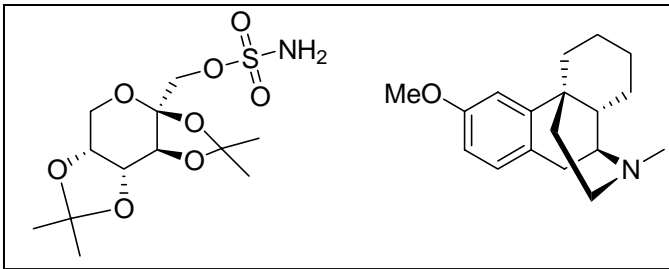


Fig. 8 : Topiramate et Dextromethorphan

ii. Molécules neurotrophiques

Le **Xaliprodène** (Xalipra®), un agoniste du récepteur 5-HT<sub>1A</sub>, stimule la synthèse de facteurs de croissance tel que le BDNF, CDNF et le NGF. Il est capable de promouvoir la survie des motoneurons *in vivo*<sup>20</sup>. Malheureusement, cette molécule a été retirée du développement clinique à cause d'un manque d'efficacité. D'autres stimulants neurotrophiques en phase clinique sont le **Buspirone** et le **Letepirim**.

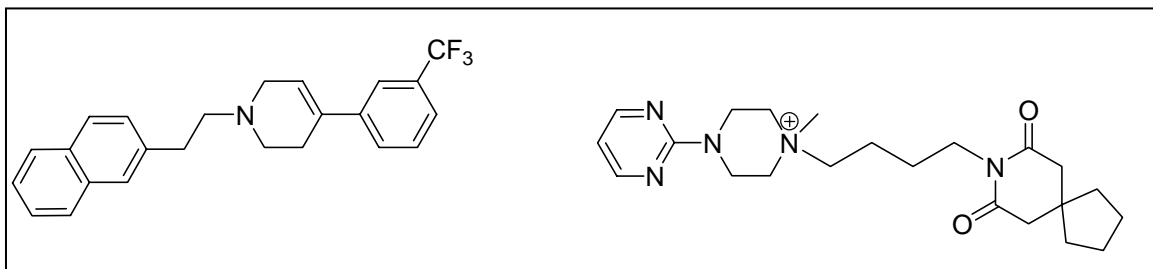


Fig. 9 : Xaliprodène et Buspirone

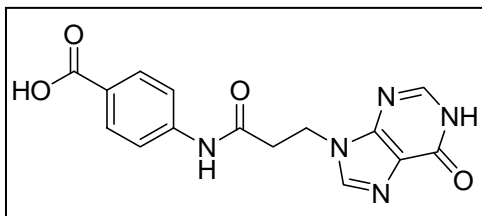


Fig. 10 : Letepirim

## C. Les facteurs neurotrophiques comme agents thérapeutiques

### 1. Les facteurs neurotrophiques naturels

Le rôle des facteurs de croissance naturels, en particulier ceux spécifiques au système nerveux, les facteurs neurotrophiques, est de promouvoir la survie, la différenciation et l'activité synaptique des neurones<sup>21</sup>. Ces macromolécules sont des agents essentiels au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle du système nerveux. L'absence de ces facteurs de croissance se traduit par une mort cellulaire programmée des neurones connue sous le nom d'apoptose.

Les facteurs neurotrophiques naturels sont des protéines endogènes (13 à 24 kDa). Les principaux rôles physiologiques de ces polypeptides naturels s'exercent à plusieurs niveaux : la croissance neuronale normale, le maintien des capacités de stimulation ou de réponse des neurones et probablement l'inhibition de l'apoptose. Ils contrôlent le développement du système nerveux et sont essentiels au maintien des fonctions cérébrales nerveuses ainsi qu'aux phénomènes de plasticité adaptative certes diminués, mais persistent néanmoins chez l'adulte.

Toutes ces propriétés rendent les facteurs neurotrophiques prometteurs en tant qu'agents thérapeutiques pour les neuropathies dégénératives. La plupart des maladies neurodégénératives sont caractérisées par l'affection d'une catégorie spécifique de neurones (neurones cholinergiques pour la maladie d'Alzheimer, neurones dopaminergiques pour la maladie de Parkinson). Des facteurs neurotrophiques particuliers (Nerve Growth Factor pour la maladie d'Alzheimer, Glial-cell Derived Neurotrophic Factor pour la maladie de Parkinson) permettent de protéger et de régénérer les populations neuronales ou gliales touchées. Des études sur des modèles animaux de neurodégénérescence ont montré de très bons effets<sup>22</sup>.

Les résultats obtenus en phase clinique ont cependant été décevants. L'efficacité thérapeutique des facteurs neurotrophiques est fortement liée aux problèmes de la voie d'administration. La demi-vie très courte de ces polypeptides rend leur administration systémique difficile et entraîne des effets secondaires, probablement dus à l'activation de récepteurs périphériques. De plus, les facteurs neurotrophiques, de par leurs propriétés physico-chimiques, ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique.

Différentes approches ont cependant été développées pour permettre aux facteurs neurotrophiques d'atteindre le cerveau. Outre la transplantation de cellules génétiquement modifiées exprimant des facteurs neurotrophiques, l'utilisation de pompes à perfusion

continue, reliées par cathéter à la zone cible ou l'implantation dans le cerveau de polymères à résorption lente diffusant le facteur neurotrophique, sont en cours d'étude.

L'utilisation de composés lipidiques exogènes capables de traverser la barrière hémato-encéphalique et de mimer les actions de facteurs neurotrophiques ou d'induire la synthèse de ceux-ci constitue également une approche intéressante.

## 2. Les facteurs neurotrophiques de substitution

Les substituants de facteurs neurotrophiques naturels peuvent être divisés en deux classes :

- les neurotrophines se liant aux récepteurs tyrosine kinase de la famille trK
- les cytokines neuropoïétiques et d'autres facteurs de croissance tels que le FGF (Fibroblast Growth Factor) et le EGF (Epidermal Growth Factor) décrits comme facteurs de croissance de tissu non nerveux, possédant également des propriétés neurotrophiques.

Pour qu'un composé puisse être assimilé à un facteur neurotrophique, il faut qu'il remplisse plusieurs conditions :

- Il doit promouvoir la croissance, la différenciation et la survie des neurones dans les conditions physiologiques.
- Il doit protéger les neurones, voire réparer les dégâts causés aux neurones au cours de maladies neurologiques par des toxines ou par des traumatismes.

Ces composés exogènes peuvent agir sur les cellules nerveuses selon deux voies distinctes :

- directement sur les récepteurs à tyrosine kinase, mimant ainsi les effets des facteurs neurotrophiques naturels
- indirectement, en stimulant la synthèse de facteurs de croissance endogènes

Il existe également des composés non protéiques capables d'assurer ces rôles. Ces molécules peuvent ainsi être considérées comme des facteurs neurotrophiques non protéiques.

### a. Exemples de la littérature de molécules neurotrophiques

Depuis quelques années, de nombreuses molécules non-protéiques ayant une activité neurotrophique (induction de la croissance et de la différenciation de lignées de cellules nerveuses en culture) ont été décrites.

Les composés les plus connus sont respectivement la **lactacystine**<sup>23</sup> et l'**épolactaène**<sup>24</sup>(fig. 11).

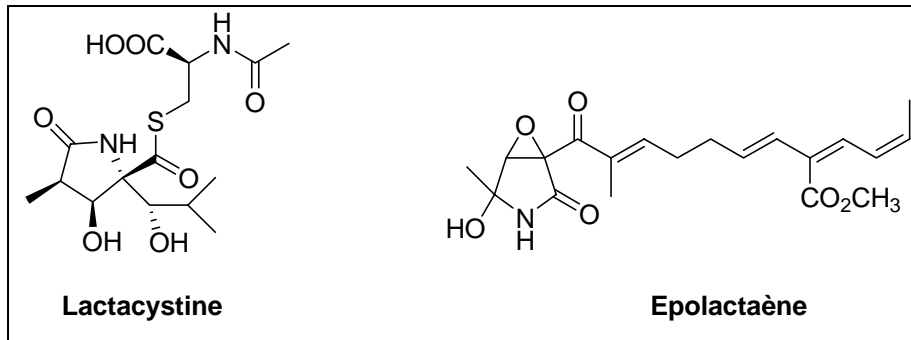


Fig. 11 : Facteurs neurotrophiques non-protéiques

La **lactacystine** a été isolée de *Streptomyces* sp. OM-6519. Cette molécule induit la croissance et la différenciation de neurones (lignée Neuro 2A) à la concentration de 1  $\mu\text{M}$  et sa toxicité apparaît à partir de 12  $\mu\text{M}$ . Des études de relation structure activité ont montré que la liaison thioester ainsi que la partie  $\gamma$ -lactame sont essentielles pour l'activité biologique.

L'**épolactaène** a été isolé de *Penicillium* sp. BM1689-P. Ce composé induit la croissance et la différenciation de cellules nerveuses (lignée SH-SY5Y) à une concentration de 25  $\mu\text{M}$ . Il est instable à la lumière, et une étude de relation structure activité a montré que la fonction carbonyle ainsi qu'une longue chaîne insaturée en position 3 étaient essentielles pour l'activité biologique.

Le **FK506** est un immunosuppresseur utilisé dans la prévention des rejets d'organes transplantés (fig. 12)<sup>25</sup>. *In vitro*, ce composé ainsi que des analogues **N-glycoylés** augmentent la croissance des neurones dopaminergiques. Ils sont capables de stimuler la croissance axonale et de rétablir les fonctions neurales après une lésion dans un modèle de la maladie de Parkinson.

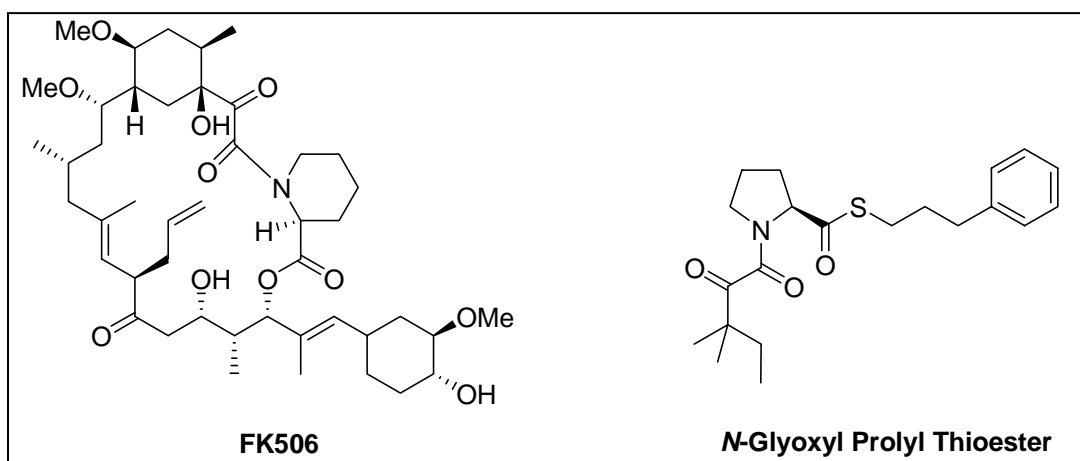


Fig. 12 : Immunosuppresseurs ayant des propriétés neurotrophiques

b. Les alcools à longue chaîne hydrocarbonée

Par le passé, une équipe de notre laboratoire a étudié des plantes utilisées dans la pharmacopée chinoise pour leurs vertus cicatrisantes. Il est connu que, dans certaines conditions physiologiques, il existe une relation entre les facteurs neurotrophiques et la cicatrisation cutanée.

Notre équipe a pu montrer la présence de composés capables de promouvoir la survie et la différenciation des neurones dans une plante possédant une activité cicatrisante, l'*Hygrophila erecta* (famille des Acanthacées originaires du Sud-Est asiatique). La plus active de ces substances est l'**hexacosanol** (fig. 13), un alcool primaire à longue chaîne hydrocarbonée contenant 26 atomes de carbones<sup>26</sup>.

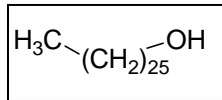


Fig. 13 : Hexacosanol

L'hexacosanol présente plusieurs des propriétés biologiques des facteurs neurotrophiques. Il est cependant très faiblement soluble, aussi bien dans les milieux aqueux que dans les milieux organiques. Cette faible solubilité engendre de mauvaises reproductibilités des expériences biologiques et restreint les possibilités d'investigation thérapeutique.

D'autres composés comportant le motif alcool à longue chaîne, pourvus de propriétés neurotrophiques semblables tout en présentant une meilleure solubilité, ont ainsi été recherchés.

c. Les alcools gras cyclohexéniques

Différentes études de relation structure activité ont permis de démontrer les activités neurotrophiques des analogues du rétinol et du perhydrorétinol (fig. 14)<sup>27</sup>.

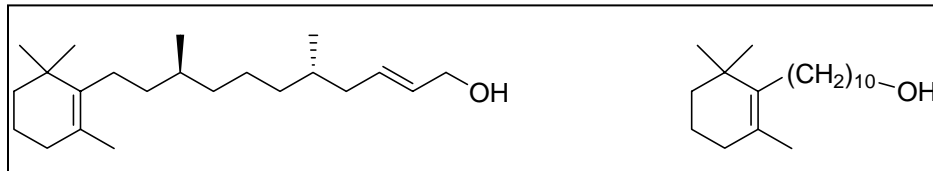


Fig. 14 :  
Analogues du rétinol.

Des dérivés quinoniques (**Idébénone**) (Schéma 14) comportant un alcool gras sont capables de stimuler la synthèse de Nerve Growth Factor (NGF), induisant ainsi la croissance, la survie et la différenciation des neurones de façon indirecte<sup>28</sup>. Ces études ont permis d'établir que la longueur de la chaîne ω-hydroxylée, ainsi que la présence d'un cycle oxygéné, étaient déterminantes pour l'activité biologique.

Partant sur ces bases, la synthèse d'alcools gras cyclohexéniques a été entreprise afin d'étudier l'effet d'une fonction énone sur l'activité neurotrophique<sup>29</sup>.

Une cyclohexénone triméthylée comportant une chaîne  $\omega$ -hydroxylée à 15 atomes de carbones, le **tCFA15** (trimethyl Cyclohexenonic Fatty Alcohol) (fig. 16), a montré les meilleurs activités *in vitro*<sup>30</sup>.

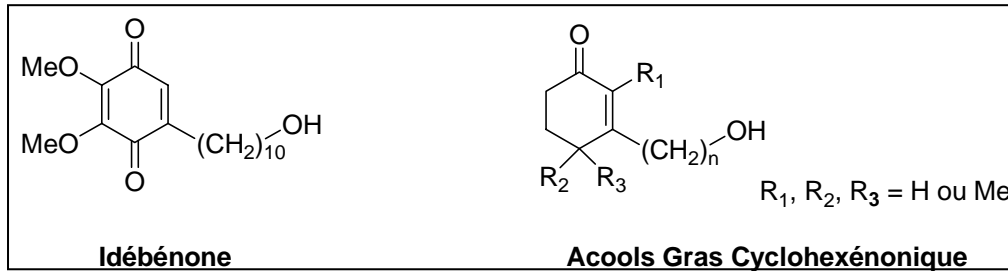


Fig. 15 : Alcools gras quinonique et cyclohexénonique

Le tCFA15 est capable de promouvoir la différenciation de neurosphères dérivant des cellules souches neurales à une concentration de  $10^{-7}$  M. Il agit non seulement sur la maturation cellulaire mais, également sur le déterminisme, en favorisant la production de neurones au détriment des astrocytes.

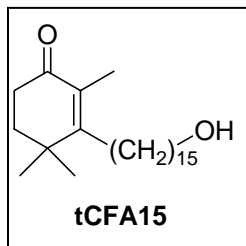


Fig. 16 : Mimétique de facteurs neurotrophiques

Le tCFA15 a ainsi démontré les mêmes effets biologiques que les facteurs neurotrophiques naturels, et possède par conséquent un potentiel intéressant pour le traitement des neuropathies dégénératives.

## D. Maladies neurodégénératives et atteintes axonales

### 1. Généralités

Les maladies neurodégénératives se divisent en deux catégories bien distinctes<sup>31</sup> :

- les maladies axogéniques : la lésion commençant au niveau de l'axone
- les maladies somagéniques : la lésion commençant au niveau du soma.

Dans les deux cas, l'issue de la maladie est la perte neuronale. Cependant, dans les maladies axogéniques (glaucome ou sténose spinale) la mort neuronale est plus tardive. Dans le cas des maladies somagéniques (Alzheimer, ALS), la perte neuronale est plus rapide mais les lésions observées au niveaux des axones peuvent aussi être contournées pour assurer, sinon un recouvrement fonctionnel total, au moins un recouvrement partiel.



## 2. Réponse gliale

Lors d'une atteinte du SNC, il y a toujours une gliose réactionnelle, aussi appelée la cicatrisation gliale (p.19). Il est aussi important de distinguer deux sortes de cicatrices bien distinctes<sup>32</sup> :

- la cicatrice anisomorphe, qui concerne le SNC et la barrière hémato-encéphalique
- la cicatrice isomorphe, qui concerne uniquement le SNC.

Dans les deux cas, les processus de cicatrisation sont similaires et concernent de nombreuses cellules et de nombreuses molécules de signalisation.

## 3. Atteintes axonales<sup>33</sup>

La mort cellulaire des motoneurones observée chez les malades (ou souris mutantes) atteints d'ALS serait la cause de la perte fonctionnelle suivie de la dégénérescence axonale affectant ces mêmes neurones. En effet, cette dégénérescence est entamée bien avant le début de la perte neuronale.

Parmi les lésions axonales observées, il a été constaté :

- une longueur axonale diminuée de plus de 50%,
- une morphologie normale du cône de croissance du neurone avec cependant l'apparition de zones d'inflammations caractérisées par un marquage irrégulier à la tubuline. Ceci traduit un défaut de la formation des microtubules,
- des mutations de la dynéine, protéine utilisée lors du transport axonal le long des microtubules.

Ces observations sont à l'origine de l'hypothèse axonale des maladies somagéniques engendrées par une dégénérescence des axones des motoneurones.

Durant ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'aspect neuritique, et précisément axonal des maladies neurodégénératives, ainsi qu'aux atteintes anisomorphes du SNC (lésions accidentelles).

## **II. CICATRISATION GLIALE ET REGENERATION NERVEUSE**

### **A. La croissance axonale**

Lors du développement du SNC, les neurones projettent leurs axones à des distances considérables pour atteindre la cible à innover. Sur le chemin, le « cône de croissance » situé à l'extrémité de l'axone, réagit à la présence de signaux attractifs ou répulsifs. Ces signaux,

solubles ou membranaires, agissent respectivement à distance ou localement. Il est connu que de nombreux signaux peuvent être bifonctionnels et ceci serait dû à la biologie intrinsèque du cône de croissance.

Lors d'une lésion du SNC, les axones lésés doivent en théorie réinnervier leurs cibles. Cette réinnervation se fait de la même façon que lors du développement, le « cône de croissance » de l'axone étant le principal acteur. Elle est inhibée par la formation post-lésion d'une « cicatrice gliale ».

Dans un premier temps, nous nous intéresserons au « cône de croissance » et à sa biologie intrinsèque.

### 1. Dynamique moléculaire du cône de croissance

A l'extrémité de l'axone naissant, ou régénérant dans le cas d'une lésion du SNC, se trouve le cône de croissance. Il est capable de reconnaître et de répondre rapidement aux facteurs présents dans le milieu environnant.

Il est composé de deux structures bien distinctes :

- les lamellipodes : portant un réseau complexe de filaments d'actine,
- les filopodes : structures labiles composées de paquets de F-actine qui peuvent palper le milieu extracellulaire.

Ce réseau d'actine est associé, dans la portion proximale du cône de croissance, aux microtubules de la région distale de l'axone et contribue à l'assemblage et la translocation de ces derniers (fig. 17)<sup>34</sup>.

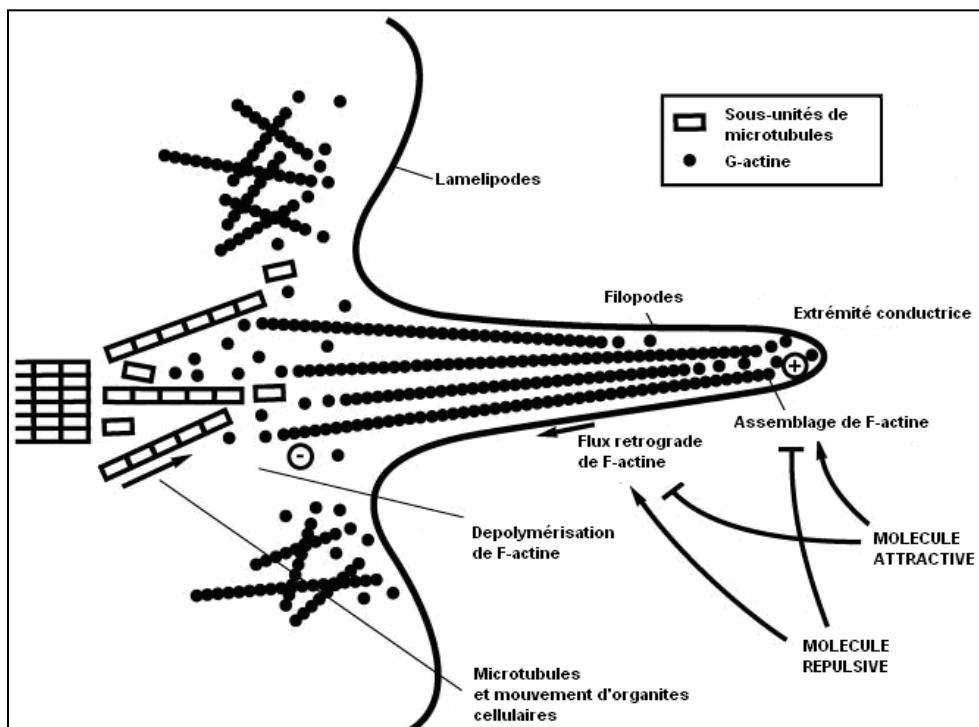


Fig. 17 : Schéma représentatif d'un cône de croissance et du cytosquelette sous-jacent.

## 2. Facteurs protéiques régulant la dynamique du cytosquelette

La signalisation du cône de croissance implique l'action de petites protéines monomériques appartenant à la famille Rho. Ces protéines lient le GTP (Guanosine TriPhosphate) seraient les régulateurs clés de la dynamique du cytosquelette d'actine. Les membres de la famille Rho dirigent la contraction actine-myosine dépendante, tout en contrôlant le flux rétrograde de F-actine au sein du cône de croissance. Les protéines les mieux étudiées actuellement sont : Cdc42, Rac et Rho A.

Une protéine Rho est active lorsqu'elle est liée au GTP. L'hydrolyse de la molécule de GTP en GDP inactive la protéine<sup>35</sup>. Ce processus de switch-on / switch-off est régulé de deux manières différentes :

- une propriété GTPasique intrinsèque de la protéine Rho,
- l'activité de deux protéines distinctes : les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) qui « allument » Rho en remplaçant le GDP par un GTP et les GAPs (GTPases Activating Proteins) qui « éteignent » Rho en activant sa propriété GTPasique.

Ces propriétés sont représentées dans la figure 18.

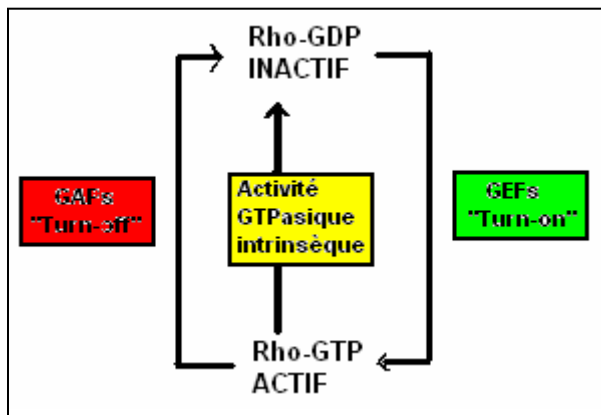


Fig. 18 : Activation et inactivation des protéines Rho par leur activité GTPasique intrinsèque ou par le biais de protéines telles que GEF ou GAP.

Les protéines Rho sont les actrices principales de la croissance axonale. Naturellement, cela n'exclut pas la présence d'autres cibles moléculaires ayant une activité tout aussi importante. Dans la suite de l'exposé, nous présenterons plus en détail l'activité de ces différentes molécules.

## B. La cicatrisation gliale

### 1. Mise en place de la cicatrisation gliale

Lorsqu'il est lésé, le SNC subit une réponse à cette lésion, connue sous le nom de « gliose réactionnelle » ou « cicatrisation gliale ». Quelle que soit la nature de la lésion, cette réponse est toujours présente. Suite à une période initiale de dommage et de mort cellulaire, tout traitement visant à réparer les dégâts du SNC devra tenir compte de la présence de cette cicatrice gliale. Il est important de connaître les différents acteurs, aussi bien cellulaires que moléculaires, qui sont à l'origine de l'inhibition de la croissance axonale.

En effet, les événements cellulaires prenant place au sein de la cicatrice évoluent sur plusieurs jours. Il est ainsi clair que la « cicatrice gliale » est une structure évolutive avec des cellules variées intervenant à des moments différents. Les premières cellules à atteindre le lieu de la lésion sont les macrophages du système vasculaire et les cellules microgliales. Après 3 à 4 jours, un grand nombre de précurseurs d'oligodendrocytes sont recrutés des tissus environnants. Des cellules des méninges sont recrutées uniquement si la lésion concerne aussi les méninges. La structure finale de la cicatrice gliale est en grande partie astrocytaire. Ces cellules se divisent activement et migrent au niveau de la lésion pour combler les espaces vacants.

### 2. Les acteurs cellulaires

Parmi les cellules présentes au sein de la cicatrice gliale, nous trouvons :

- \* les **oligodendrocytes** : à l'origine des débris myéliniques<sup>36</sup> rencontrés dans la cicatrice
- \* les **cellules microgliales** : activées après la lésion, elles y migrent<sup>37</sup> et prennent une structure « macrophage-like »
- \* les cellules des méninges : elles reforment les couches gliales entourant le SNC
- \* les **précurseurs d'oligodendrocytes**<sup>38</sup> : recrutés pour se différencier en oligodendrocytes au sein même de la cicatrice
- \* les **astrocytes** : recrutés directement après la lésion, ils sont très rapidement hypertrophiés, avec de nombreux prolongements et se divisent activement
- \* les **progéniteurs multipotents** : cellules exprimant la nestine, elles sont retrouvées au sein de la cicatrice ou elles se différencient en astrocytes<sup>39</sup>. Leur rôle n'est pas connu.

### C. Les cellules inhibitrices de la croissance axonale

Une raison majeure de l'absence de régénération axonale au sein du SNC est la nature inhibitrice de l'environnement glial. Il est cependant important de noter que la capacité de régénérescence des axones du SNC est faible<sup>40</sup>. Ainsi, de faibles degrés d'inhibition peuvent prévenir la régénération. Puisque toute lésion du SNC va de pair avec l'apparition d'une cicatrisation gliale, la régénération nerveuse doit se confronter à l'environnement inhibiteur de cette première. Tous les types cellulaires constitutifs de la cicatrice gliale ont des propriétés inhibitrices et peuvent ainsi stopper la régénération axonale.

#### 1. Les astrocytes

De par la structure même de la cicatrice gliale, il est évident que tout axone voulant la traverser sera confronté à un environnement hautement astrocytaire<sup>41</sup>. De nombreuses expériences *in vivo* et *in vitro* ont montré que ce tissu peut être de nature à la fois très inhibitrice et activatrice en matière de régénération axonale. Il en a été déduit que dans un tissu sain, les astrocytes sont capables de promouvoir la régénération axonale. Suite à une lésion du SNC, la formation de la cicatrice gliale, très riche en astrocytes, devient un milieu très inhibiteur de la régénération. La question reste cependant entière : qu'est ce qui fait qu'un astrocyte peut être activateur ou inhibiteur ? Existe-t-il différents sous-types d'astrocytes ?

Il est connu que différentes morphologies astrocytaires sont présentes au sein du SNC, ainsi qu'au sein de la cicatrice gliale. Des expériences effectuées par Davies et coll.<sup>42</sup> sur des lésions du SNC montrent que les astrocytes distaux de la cicatrice gliale sont très permissifs à la régénération axonale alors que les astrocytes proximaux sont très inhibiteurs. Ces résultats suggèrent que la lésion est à l'origine d'une libération de différents facteurs qui changent la fonction astrocytaire permissive en inhibitrice.

De nombreuses études ont montré que les astrocytes de la cicatrice gliale présentent des différences moléculaires très prononcées en matière de constituants sécrétés, transmembranaires et de matrice extracellulaire. Parmi toutes les molécules ainsi synthétisées, il est établi que les plus inhibitrices sont les « chondroïtine sulfate protéoglycanes » présentes au sein même de la cicatrice gliale.

Il est aussi important de noter que les nombreuses expériences montrant la permissivité des astrocytes à la régénération axonale ont été effectuées *in vitro* sur des monocouches d'astrocytes<sup>43</sup>. Or, une monocouche d'astrocyte n'est absolument pas représentative de la réalité intrinsèque de la cicatrice gliale. En effet, *in vitro*, les axones n'ont pas besoin de pénétrer un tissu dense et peuvent simplement passer par dessus la monocouche astrocytaire. Un autre point important est que la sécrétion de différents facteurs inhibiteurs par les

astrocytes est masquée par un effet de dilution très important dû au milieu de culture lui-même. Or, dans la cicatrice gliale, les facteurs sécrétés localement restent piégés dans les espaces intercellulaires et sont, de ce fait, beaucoup plus concentrés. Cet effet de dilution *in vitro* est très important pour de nombreux protéoglycanes, protéases, inhibiteurs de protéases, facteurs de croissance et cytokines. Une expérience mettant ceci en évidence a été effectuée par Fawcett et coll.<sup>44</sup> Des astrocytes cultivés dans des tubes millipore très fins, de manière à constituer un tissu astrocytaire tridimensionnel, deviennent très inhibiteurs de la régénération axonale.

Enfin, une autre explication de la forte inhibition de la cicatrice gliale repose sur sa structure même. En effet, la charpente astrocytaire qui constitue la cicatrice gliale est un milieu très dense et impénétrable pour la régénération des axones. Cette cicatrice constituerait alors une barrière physique et mécanique hautement inhibitrice de la régénération axonale.

## 2. Les oligodendrocytes

La régénération axonale est impossible dans les endroits myélinisés du SNC, alors qu'elle est limitée dans les endroits non myélinisés. En effet, les oligodendrocytes matures *in vitro* sont non permissifs à la régénération axonale<sup>45</sup> et provoquent un collapsus du cône de croissance. L'administration, *in vivo*, d'anticorps IN-A sur un site de lésion neutralise le constituant de la myéline dit NI250/Nogo. Nous notons alors une régénération axonale. Les oligodendrocytes sont les cellules capables de synthétiser la myéline. Or, plusieurs de ses composants (Nogo, MAG (myelin-associated glycoprotein), OMgp et la tenascin R) sont de nature inhibitrice. Les oligodendrocytes matures sont donc clairement des cellules inhibitrices de la régénération axonale.

## 3. Les précurseurs d'oligodendrocytes

Le rôle des précurseurs d'oligodendrocytes n'est pas encore clair. Cependant, leur présence dans la zone de cicatrisation gliale fait d'eux des acteurs de la réponse de cette même cicatrice à la régénération axonale<sup>38</sup>. En effet, il a été montré que des extraits purifiés du protéoglycane NG2 trouvé sur la surface des précurseurs d'oligodendrocytes, sont capables d'inhiber la croissance axonale *in vitro*.

## 4. La microglie

Les cellules microgliales sont activées par une lésion du SNC. Elles se divisent et migrent vers le site de lésion. Ainsi, la cicatrice gliale se trouve envahie par un grand nombre de ces cellules. Elles sont capables de produire des molécules de défense très toxiques. La microglie

activée a, en effet, les mêmes propriétés que les macrophages et peut ainsi subir une hyper activité respiratoire et libérer de nombreux radicaux libres oxygénés, de l'oxyde nitrique, des dérivés de l'acide arachidonique et d'autres molécules toxiques<sup>46</sup>. Cependant, des expériences effectuées par Rabchevshy et Streit montrent que des cellules microgliales implantées seules dans un site de lésion du SNC permettent une certaine régénération axonale<sup>47</sup>. Par ailleurs, des cellules microgliales injectées sur un site de lésion en présence d'astrocytes rendent ces derniers permissifs à la croissance axonale.

Il a donc été suggéré que la microglie est capable d'aider la régénération nerveuse sur un site de lésion, à la seule condition qu'aucun facteur, quel qu'il soit, ne la rende neurotoxique. Sa présence dans la cicatrice gliale serait certainement en faveur d'une régénération axonale.

## 5. Les cellules des méninges

Les cellules des méninges migrent vers l'endroit de la lésion pour former une couche de cellules qui recouvre la cicatrice gliale sous laquelle se reforment les limitants gliaux. L'invasion de la cicatrice par les cellules des méninges est souvent observée dans le cas de lésions de la moelle épinière, mais ne se fait pas obligatoirement. Ces cellules ne sont pas a priori un bon substrat pour la régénération axonale. En effet, malgré leur capacité à synthétiser de grandes quantités de laminine, molécule promotrice de la croissance axonale, des axones régénérants ne sont jamais observés parmi elles<sup>48</sup>. Elles sont aussi capables de synthétiser le protéoglycane NG2, même si leur nature inhibitrice n'ait jamais été reliée à cette molécule. Par ailleurs, elles synthétisent également de la tenascine, molécule fortement inhibitrice de la régénération axonale.

### **D. Les molécules inhibitrices de la croissance axonale**

Il est établi qu'une lésion du SNC engendre une cicatrization gliale constituée de différents types cellulaires produisant différentes molécules inhibitrices.

#### 1. Les protéines associées à la myéline

Suite à une lésion du SNC, la rupture des axones myélinisés est à l'origine de débris de myéline dispersés au sein de la zone de cicatrization gliale. Ces débris sont éliminés grâce à l'activité phagocytaire de la microglie et des macrophages. Ce processus étant lent, ces débris restent longtemps au sein même de la zone de cicatrization. Parmi ceux-ci, nous trouvons : Nogo exprimé à la surface de la myéline et présent dans des extraits de myéline, MAG sur la membrane des oligodendrocytes ainsi que sous forme soluble, OMgp également sur la

membrane des oligodendrocytes et la Tenascine R présente dans la substance blanche et au sein de la matrice extracellulaire.

a. Nogo

Nogo possède une activité de collapsus du cône de croissance. Son activité inhibitrice est stoppée par l'anticorps IN-1 qui reconnaît des fractions de myéline. Différents groupes ont identifié le gène *nogo* et la protéine correspondant à l'antigène reconnu par IN-1. Le gène *nogo* subit un épissage différentiel de manière à générer trois protéines différentes avec des extrémités N-terminales différentes. L'isoforme le plus long est Nogo A qui contient une séquence unique, appelée « amino-Nogo » portant un grand pourcentage d'acides aminés<sup>49</sup>. C'est une protéine transmembranaire avec ses extrémités N- et C-terminales intracellulaires. Un boucle extracellulaire portant une autre séquence appelée « Nogo-66 » est à l'origine de l'activité inhibitrice de Nogo A, ainsi que la séquence amino-Nogo. Aussi bien « amino-Nogo » que « Nogo-66 » présentent une activité inhibitrice qui s'expliquerait par l'existence de deux conformations transmembranaires différentes où les deux parties intéressantes / inhibitrices de Nogo A seraient exposées à la surface des oligodendrocytes. L'isoforme Nogo A est exprimé par les oligodendrocytes myélinisants du SNC, et pas par les cellules de Schwann qui myélinisent le SNP. Nogo B est un isoforme mineur peu rencontré, alors que Nogo C est un isoforme retrouvé dans le SNP.

b. MAG

Des fractions purifiées de MAG sont clairement inhibitrices *in vitro* et présentes dans le SNC, aussi bien à la surface des oligodendrocytes, que sous forme soluble. Son activité inhibitrice est modulable par divers facteurs de croissances par un mécanisme dépendant de l'AMPC. MAG est une protéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines<sup>45</sup>. Elle contient cinq boucles immunoglobulines (Ig). Elle existe sous deux isoformes différents, variant uniquement au niveau du domaine intracellulaire. Elle est retrouvée aussi bien dans le SNC que dans le SNP, située sur les membranes périaxonales, facilitant ainsi son interaction avec des récepteurs axonaux.

c. OMgp

OMgp a été récemment identifié comme un puissant inhibiteur de la croissance axonale présent dans la myéline du SNC<sup>50</sup>. C'est une protéine membranaire greffée sur un glycosylphosphatidylinositol (GPI). Elle ne contient donc pas de domaine intracellulaire. Contrairement à ce qu'indique sa nomination, OMgp n'est pas exprimé uniquement dans les



oligodendrocytes. En effet, il a été trouvé à la surface de nombreux neurones. C'est un composant mineur de la myéline et, de la même manière que Nogo et MAG, il induit le collapsus du cône de croissance des axones régénérants.

#### d. Tenascine R

La tenascine R est présente dans la matrice extracellulaire au sein du SNC, dans la substance blanche. Elle est synthétisée par les oligodendrocytes et surexprimée après une lésion. *In vitro*, elle est capable d'inhiber la régénération axonale de différents types neuronaux.

### 2. Les chondroïtines sulfate protéoglycanes

Un autre type majeur de molécules inhibitrices du SNC lésé est constitué par les chondroïtines sulfate protéoglycanes (CS-PGs). Il a été longtemps considéré que les CS-PGs d'un site de lésion sont synthétisés par les astrocytes constitutifs de la cicatrice gliale. De nouvelles avancées ont permis de vérifier qu'une autre source de CS-PGs serait les oligodendrocytes et les cellules des méninges.

Il y a trois raisons pour lesquelles les CS-PGs sont considérés comme des molécules inhibitrices de la régénération nerveuse :

- \* une surexpression de CS-PGs au sein même du site de lésion. En effet, une forte concentration de CS-PGs a été observée quelques jours après une lésion. De plus, il a été prouvé que la régénération axonale s'arrête précisément dans la zone où se situent les CS-PGs<sup>51</sup>.

- \* de nombreux CS-PGs purifiés ont été utilisés *in vitro* pour montrer leur effet inhibiteur sur la croissance axonale. Parmi ceux-ci, on trouve l'aggrecan, le brevican, le versican, le neurocan, tous présents dans le SNC<sup>52</sup>.

- \* une digestion enzymatique des CS-PGs sur un site de lésion est une condition suffisante pour une reprise de la régénération axonale<sup>53</sup>.

Ces trois constatations sont une preuve irréfutable que les CS-PGs sont de forts inhibiteurs de la croissance axonale à travers la cicatrice gliale.

### 3. Les sémaphorines

Les sémaphorines constituent une grande famille de molécules secrétées ou transmembranaires, classées en huit groupes différents basés sur des caractéristiques structurales distinctes, notamment leur extrémités C-terminal. Les sémaphorines de classe 1 et 2 sont présentes chez les invertébrés, les classes 3 à 7 chez les vertébrés et la classe V chez les virus<sup>54,55</sup>. Le rôle des sémaphorines est très varié au sein d'un organisme. Elles possèdent un

domaine Sema bien conservé entre les différentes classes. La figure 19 représente les différentes classes de sémaphorines.

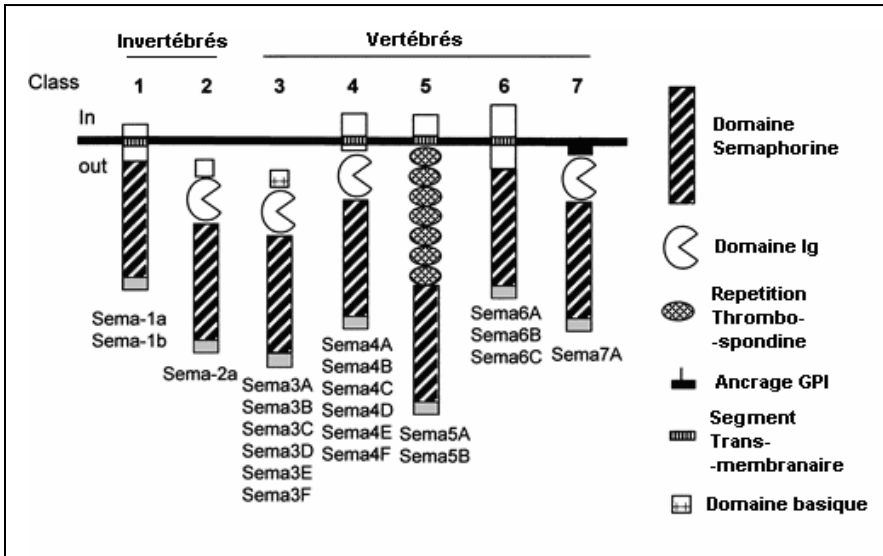


Fig.19 : Schéma représentatif des sémaphorines des classes 1 à 7 et de leurs caractéristiques structurales.

Elles agissent sur :

- le guidage axonale
- la modulation de la réponse immunitaire
- l'organogénèse
- l'angiogénèse
- l'apoptose neurale

Elles ont en outre été impliquées dans diverses maladies telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie du Cri-du-chat ou la dégénérescence des neurones moteurs.

Dans le SNC sain, une sémaphorine de classe 3, nommée Sema3A, a une activité chimioréulsive et constitue ainsi une barrière infranchissable pour les axones en croissance. Suite à une lésion du SNC, la Sema3A de nature répulsive est surexprimée dans la cicatrice gliale. Nous notons en effet une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour cette dernière. Curieusement, la distribution des cellules surexprimant la Sema3A varie en fonction de l'emplacement de la lésion :

- une lésion au niveau du cerveau provoque une surexpression de la Sema3A dans tout le site de lésion
- une lésion au niveau de la colonne vertébrale se traduit par une surexpression de la Sema3A uniquement sur la partie dorsale et les parties latérales de la lésion.

Les cellules de la cicatrice gliale surexprimant la Sema3A sont les fibroblastes (qui contribuent aussi à la formation de la cicatrice gliale) et les cellules des méninges. Cela peut paraître curieux puisque toutes les autres molécules inhibitrices sont surexprimées par les oligodendrocytes et les astrocytes. Une autre source de Sema3A, plus étonnante, serait les neurones lésés eux-mêmes.

Ainsi, suite à une lésion du SNC, les neurones intacts ainsi que ceux lésés seraient une source supplémentaire de Sema3A, renforçant davantage la nature non permissive de la cicatrice gliale à la régénération axonale<sup>56</sup>.

### E. Etude détaillée de l'effet inhibiteur des protéines de myéline et de la Sema3A

Nous avons énoncé plus haut tout un panel de molécules retrouvées dans la cicatrice gliale apparemment responsables de la non permissivité de cette dernière à la régénération axonale. Pour ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'effet inhibiteur de deux classes de molécules inhibitrices : les protéines de myéline et la Sema3A. Dans cette partie, nous essaierons de comprendre le mécanisme moléculaire de l'inhibition provoquée par ces deux composantes.

En effet, les protéines de myéline aussi bien que la Sema3A sont des ligands de récepteurs distincts qui, par une voie de signalisation propre à chacun d'eux, arrivent à arrêter la croissance d'un axone régénéréscent.

#### 1. Les protéines de myéline

##### a. Structure des protéines de myéline

Comme expliqué précédemment, les protéines de myéline sont constituées de trois composantes différentes qui sont la protéine Nogo A, OMgp et MAG. La structure de chacune d'elle est décrite respectivement en D. 1. a) b) et c).

##### b. Récepteur et co-récepteur de Nogo A, OMgp et MAG

En 2001, Strittmatter et coll.<sup>57</sup> ont cloné un gène dont la protéine résultante avait une grande affinité pour Nogo-66. Il s'agissait de la protéine NgR, ou « Nogo Receptor », exprimée à la surface des neurones. Des études supplémentaires ont montré que NgR était aussi récepteur pour MAG<sup>57</sup> et OMgp<sup>54</sup>

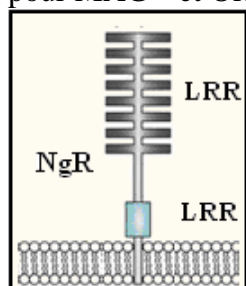


Fig. 20 : Le récepteur NgR est constitué de deux domaines LRR (Leucine Rich Repeat) et il est relié à la membrane cellulaire par un groupement GPI (glycosylphosphatidylinositol).

Il est important de noter que la configuration de Nogo exposant la séquence amino-Nogo en surface n'est pas un ligand pour NgR. Un autre récepteur serait responsable de son activité inhibitrice.

Paradoxalement, l'absence de domaine intracellulaire du NgR ne fait pas de lui un récepteur fonctionnel. Des études de copréciptation ont montré que la neurotrophine  $p75^{\text{NTR}}$  copréciptait avec Nogo, MAG, OMgp et NgR<sup>58,59</sup>.

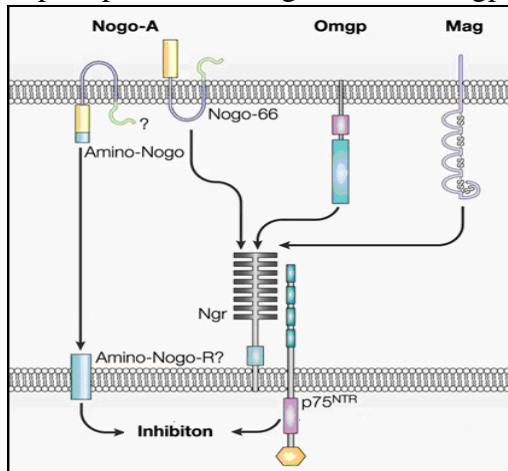


Fig. 21 : Schéma récapitulatif de l'interaction de Nogo, MAG et OMgp avec gR et son co-récepteur  $p75^{\text{NTR}}$ .

### c. La signalisation intracellulaire et la réponse cellulaire<sup>60</sup>

L'identification d'un complexe-récepteur pour les protéines de myéline suggère qu'un signal intracellulaire est initié suite à l'interaction des récepteurs avec l'un ou plusieurs des trois acteurs principaux de la myéline.

Plusieurs voies de signalisation intracellulaires sont possiblement impliquées :

- \* la protéine **Rho** qui intervient dans le réarrangement du cytosquelette axonal. Celle-ci interagirait avec  $p75^{\text{NTR}}$  pour finalement aboutir à un réarrangement du cytosquelette<sup>61</sup> résultant au collapsus du cône de croissance. Inversement, l'inactivation de Rho par la toxine C3 (exoenzyme C3 de *Clostridium botulinum*) résulte en une activation importante de la régénérescence et de la croissance axonale.

- \* les protéines G hétérotrimériques **Gi** ou **Go**<sup>62</sup> inhiberaient l'adénylate cyclase qui diminuerait les quantités intracellulaires d'AMPc. Or, cet AMPc est nécessaire pour induire la synthèse de polyamines intracellulaires bloquant l'inhibition.

- \* le **calcium** étant nécessaire à tout réarrangement du cytosquelette, il serait normalement impliqué aussi ici. La myéline est connue pour induire un influx de calcium dans les neurones et le collapsus du cône de croissance induit par Nogo et MAG serait lui aussi calcium-dépendant<sup>63</sup>. Le rôle exact du calcium ainsi que sa source intra- ou extra-cellulaire reste à être identifié.

De toutes ces données, une voie de signalisation possible est représentée sur la figure 22.

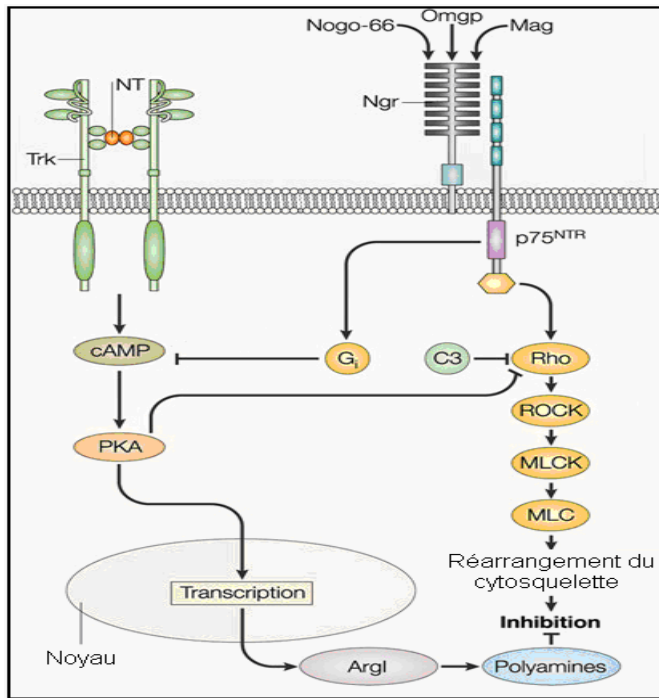


Fig. 22 : La protéine Rho est activée par son interaction avec p75<sup>NTR</sup>. Ceci entraîne l'activation de la ROCK (Rho Kinase) qui va phosphoryler le MLCK (kinase de la chaîne légère de myosine). Celle-ci va à son tour phosphoryler la MLC (Chaîne légère de myosine) qui résulte au collapsus du cône de croissance.

L'activation de la protéine G<sub>i</sub> entraîne une diminution de l'AMPc intracellulaire. Ceci inactive la PKA (protéine kinase A) qui n'active plus des facteurs de transcription permettant l'expression du gène *argl*. Les polyamines qui en résultent bloquent l'inhibition myéline-dépendante.

Même si des progrès énormes ont été effectués afin d'élucider les mécanismes intracellulaires conduisant à l'inhibition de la régénération axonale par la myéline, tout n'est certainement pas encore connu. Cela dit, le fait que toutes les composantes de la myéline agissent sur le même complexe de récepteur est encourageant en matière de thérapie, puisque tous les trois constituants de la myéline peuvent être bloqués simultanément. Cependant, comme c'est le cas pour la séquence amino-Nogo, il est possible que d'autres voies de signalisation soient activées lors de l'interaction de la myéline avec l'axone régénérantes. Naturellement, en matière de réparation totale suite à une lésion, lever l'inhibition de la myéline face à la croissance axonale ne représente qu'une seule partie d'un problème bien plus complexe. En effet, une fois les axones régénérés à travers la cicatrice gliale, ils doivent être capables d'innover les bonnes cibles, en établissant des synapses fonctionnelles. Dans la mesure où la régénérescence des axones à travers la cicatrice gliale est un des points les plus essentiels, les progrès effectués jusqu'ici sont très prometteurs.

## 2. La Sema3A

### a. Structure de la Sema3A

La Sema3A fait partie de la famille des Sémaphorines. C'est une molécule soluble dans le milieu extracellulaire, contenant un « domaine sémaphorine » constitué de 500 acides aminés, un domaine Ig et un domaine basique<sup>56</sup>. Elle est capable de provoquer le collapsus du cône de

croissance d'un axone à des concentrations aussi faibles que 10 pM. La structure de la Sema3A est représentée dans la figure 23.

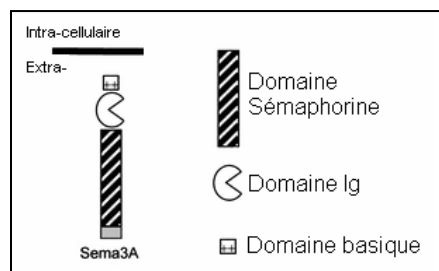


Fig. 23 : Conformation structurale de la Sema3A

Initialement, la Sema3A a été identifiée comme une molécule chimiorépulsive du cône de croissance. Cependant, des études plus récentes ont montré qu'elle peut aussi agir en tant que chimioattracteur par des changements de la quantité de GMPc intracellulaire.

#### b. Récepteur et co-récepteurs de la Sema3A

Les premiers récepteurs des Sémaphorines ont été identifiés en 1997. Il s'agit de la Neuropiline-1 (NP-1) et de la Neuropline-2 (NP-2). Ce sont des protéines transmembranaires. Le récepteur de la Sema3A est NP-1<sup>64</sup>. Les deux récepteurs peuvent former des dimères, dimérisation qui est indépendante du ligand. La formation d'hétérodimères est également possible et confère une large spécificité de substrat.

La NP-1 est nécessaire à la réponse neuronale à la Sema3A. Elle est présente dans tous les neurones qui répondent à la Sema3A. Il a été montré que l'utilisation d'anticorps anti-NP-1 abolit le collapsus du cône de croissance en présence de Sema3A.

Autre fait marquant, le récepteur NP-1 est aussi capable de se lier à la Sema3B et la Sema3C, activatrices de la croissance axonale. Ainsi, la présence simultanée de Sema3A et Sema3B ou C, ainsi que leur compétition pour NP-1, pourrait rendre certaines régions du SNC accessibles à des axones inhibés par la Sema3A.

Le récepteur NP-1 ayant un domaine intracellulaire très court, la présence d'un co-récepteur est essentielle à son activité biologique. Il s'agit des plexines<sup>65</sup> présentant des homologies de séquences avec le domaine sémaphorine.

Takahashi et Rohm ont récemment apporté des preuves montrant que les plexines pourraient être les composantes du récepteur NP-1 permettant la signalisation intracellulaire<sup>66</sup>. Les interactions plexine-NP-1 sont représentées sur la figure 24 A.

Castellani et coll.<sup>67</sup> ont démontré que la molécule d'adhésion cellulaire L1 peut co-précipiter avec la NP-1 et que des neurones de souris knock-out du gène L1 ne répondent plus à la Sema3A. Une représentation schématique de ce complexe est donnée sur la figure 24 B.

Tuttle et O'Leary<sup>68</sup> ont montré que les facteurs neurotrophiques peuvent moduler la réponse neuronale de la Sema3A. Ils ont montré que trkA (récepteur à haute affinité de NGF) et trkB

(récepteur à haute affinité de BDNF) peuvent former des complexes avec NP-1. La formation de ce complexe est représentée sur la figure 24 C.

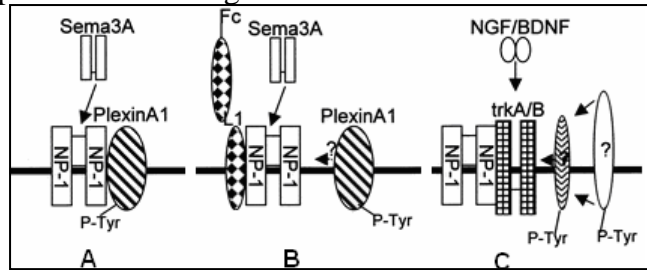


Fig. 24 : Représentation schématique de l'interaction du récepteur NP-1 avec différents types de co-récepteurs. **A** : Interaction avec les pléxines. Selon l'expression cellulaire en pléxines, un neurone peut changer de réponse face à un milieu riche en séma3A. **B** : Interaction avec la protéine L1. Si L1 est lié à une L1 soluble, le complexe ainsi formé rend la sema3A chimioattractif pour les axones. **C** : Interaction avec trkA / B. Sous la présence de NGF / BDNF, des protéines hautement phosphorylées, de nature inconnue, sont recrutés dans le complexe.

c. Voie de signalisation intracellulaire et réponse cellulaire

Suite à l'interaction de la Sema3A avec son récepteur, il a été observé une diminution des filaments d'actine du cytosquelette, ce qui va de pair avec le collapsus du cône de croissance. Cependant, la voie de signalisation qui relie le récepteur à la réponse finale de l'axone n'est pas encore connue. De nombreuses voies de signalisation pourraient être impliquées

i. Phosphorylation du complexe récepteur sur une tyrosine<sup>68</sup>

La phosphorylation de la tyrosine est un événement accru au niveau du cône de croissance. Ceci suggère un rôle possible de cette phosphorylation au cours de la réponse à la Sema3A. Une éventualité serait donc que l'interaction de la Sema3A avec le récepteur NP-1 induise la phosphorylation de la plexine adjacente, cette dernière servant ainsi de point d'ancrage pour recruter d'autres protéines intracellulaires. Ce processus est représenté dans la figure 25.

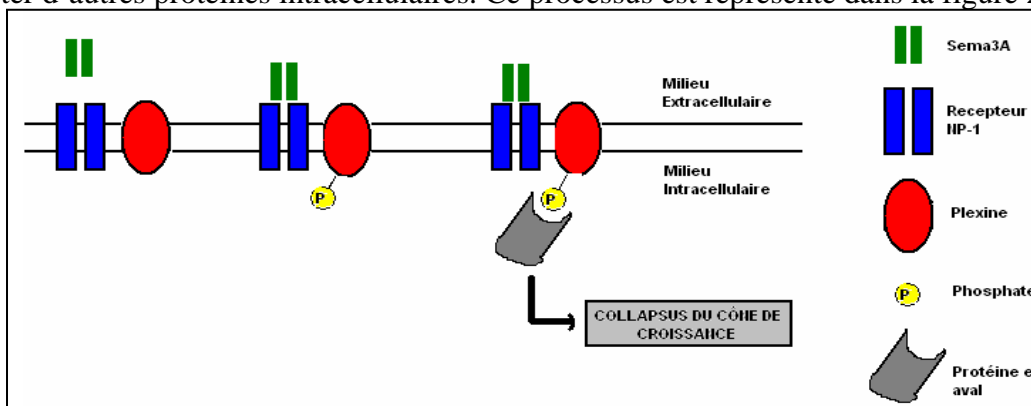


Fig. 25 : Voie possible de l'interaction de Sema3A avec NP-1. La phosphorylation de la plexine recrute des protéines intracellulaires qui par une cascade de signalisation inconnue provoqueraient le collapsus du cône de croissance.

ii. Implication de la Cofiline

La Sema3A régulerait la dynamique des filaments d'actine en phosphorylant une protéine appelée « cofiline » via une Ser/Thr kinase appelée LIM-kinase (LIMK). La phosphorylation de la cofiline l'inactivant, ceci diminue sa capacité à promouvoir l'élongation des filaments d'actine.

iii. Implication des protéines Rho

La phosphorylation du domaine intracellulaire de la plexine A1 serait un site de reconnaissance de deux protéines : Rnd1 et RhoD. Une compétition entre ces deux molécules est à l'origine de deux réponses cellulaires différentes<sup>69</sup>. Si Rnd1 s'y fixe, la plexine A1 est activée ce qui se traduit par une dépolymérisation des filaments d'actine. Si RhoD s'y fixe, la plexine A1 ne peut plus être activée. Cette compétition est représentée sur la figure 26.

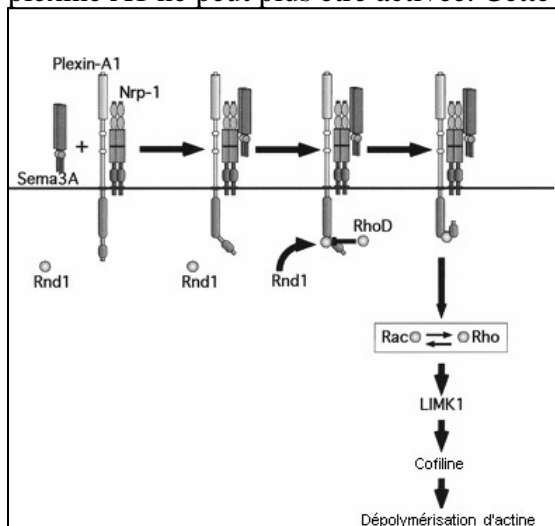


Fig. 26 : La fixation de Sema3A sur le récepteur NP-1 lié à la plexine A1 recrute Rnd1. Rnd1 a une faible activité GTPasique intrinsèque, de ce fait il est considéré comme constitutivement lié au GTP. L'interaction de Rnd1 avec la plexine A1 active cette dernière ce qui provoque la dépolymérisation de la F-actine en aval. A l'inverse, si RhoD déplace l'équilibre et se fixe lui-même sur la plexine A1, la dépolymérisation est bloqué.

Les molécules activatrices et inhibitrices de la cicatrice gliale agissent de manières diverses et variées sur différentes cibles moléculaires de la membrane du cône de croissance. Le résultat final est un collapsus du cône de croissance, généré en grande partie par les effets inhibiteurs des protéines de myéline et de la Sema3A. Cette barrière chimique infranchissable ainsi constituée, une régénération axonale à travers la cicatrice gliale est rendue impossible.

### III. QUINONES : DE PUISSANTS ANTIOXYDANTS. PROPRIETES BIOLOGIQUES ET PHYSICOCHIMIQUES

#### A. Répartition des quinones dans le monde vivant

Les quinones sont présentes chez les animaux, les végétaux et les microorganismes. Les trois types de quinones les plus courantes sont le coenzyme Q (ubiquinones, 2-méthyl-5,6-



diméthoxy-1,4-benzoquinone), les plastoquinones (2,3-diméthyl-1,4-benzoquinone) et la vitamine K (ménaquinones, 2-méthyl-1,4-naphthoquinone)<sup>70</sup> (fig. 27). Chez les animaux, nous trouvons naturellement que le coenzyme Q, la vitamine K étant apportée par l'alimentation alors que les plastoquinones sont inexistantes. Les végétaux possèdent tous les trois types de quinones avec, en prime, la tocophérolquinone. Pour la suite de l'exposé, nous nous concentrerons sur les caractéristiques et les différentes activités du coenzyme Q, quinone majeure du règne animal.

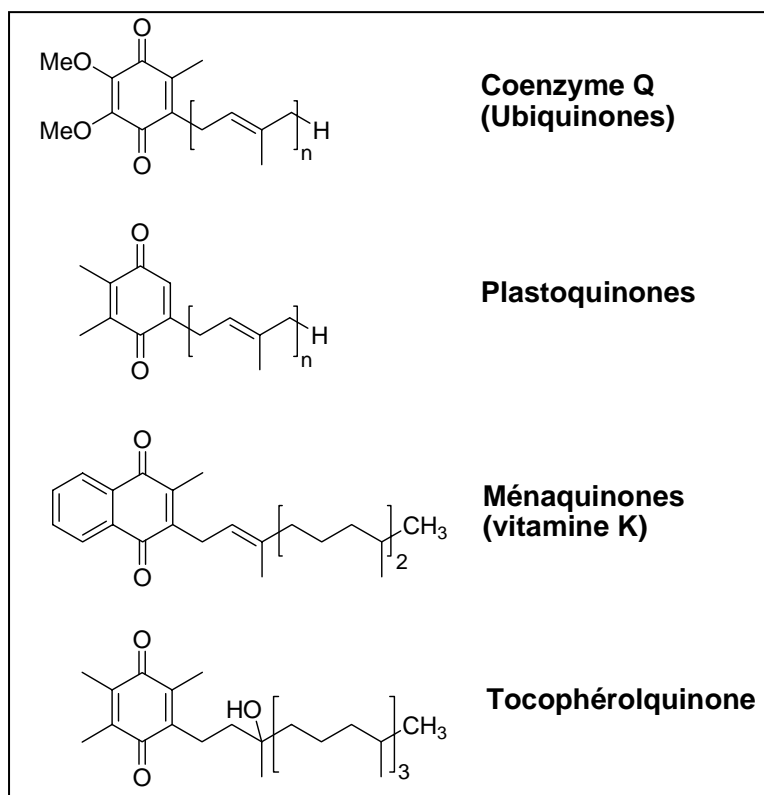


Fig. 27 : Différents types de quinones trouvées chez les êtres vivants

## B. Biosynthèse des quinones animales

Le coenzyme Q<sub>10</sub>, appelé aussi ubiquinone de par sa répartition ubiquitaire dans l'organisme, est un composé liposoluble et amphipathique. Il est constitué d'une tête benzoquinonique et d'une queue hydrophobe greffée en position C-6 du noyau benzoquinonique. Elle est constituée d'un nombre n de sous unités isopréniques en cinq carbones. La valeur de n donne le nom à la quinone. Ainsi, le coenzyme Q<sub>10</sub> est doté d'une queue hydrophobe constituée de 10 sous unités isopréniques, soit 50 atomes de carbone. Il existe plusieurs homologues du coenzyme Q chez les eucaryotes et les procaryotes classés de : Q<sub>0</sub> à Q<sub>12</sub>, le coenzyme Q<sub>10</sub> est la forme prédominante chez les humains<sup>70</sup>.

Dans les cellules des mammifères, l'ubiquinone est issue de l'interaction de deux voies métaboliques distinctes. La sous unité quinonique est issue de la tyrosine (ou

exceptionnellement de la phénylalanine) alors que la queue hydrophobe est synthétisée à partir de l'acétyl-CoA par une cascade réactionnelle connue sous la « voie du mévalonate »<sup>71, 72</sup>.

Il a été montré que dans les cellules animales, l'ubiquinone est présente dans les mitochondries, dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les lysosomes, les peroxyosomes et la membrane plasmique.

### C. Rôle biologique des quinones (quelques exemples)

Les fonctions biologiques des quinones sont diverses et variées. Dans cette partie, nous présenterons deux exemples essentiels au bon fonctionnement cellulaire : la production d'énergie cellulaire sous forme d'ATP au niveau de la chaîne respiratoire des mitochondries, et l'élimination des déchets cellulaires par les lysosomes.

#### 1. Production d'énergie cellulaire <sup>73</sup>

L'ubiquinone est un composé essentiel de la chaîne respiratoire mitochondriale en raison de ses propriétés oxydo-réductrices. Dans un premier temps, l'ubiquinone est réduite par le complexe I (CI) en ubiquinol. Celui-ci, devenant plus polaire, migre vers la surface de la membrane où il est réoxydé en ubiquinone par le complexe III (CIII). Les électrons sont par la suite véhiculés par le cytochrome c et atteignent le complexe IV (CIV) où ils réduisent l'oxygène moléculaire en eau. Lors de ce jeu d'oxydo-réductions, des protons sont véhiculés vers l'espace intermembranaire mitochondrial. Ces mêmes protons sont de nouveau véhiculés dans la matrice mitochondriale par le biais d'une ATP synthase, le complexe V (CV). Ce transit de protons permet au complexe V de synthétiser de l'ATP (fig. 28)

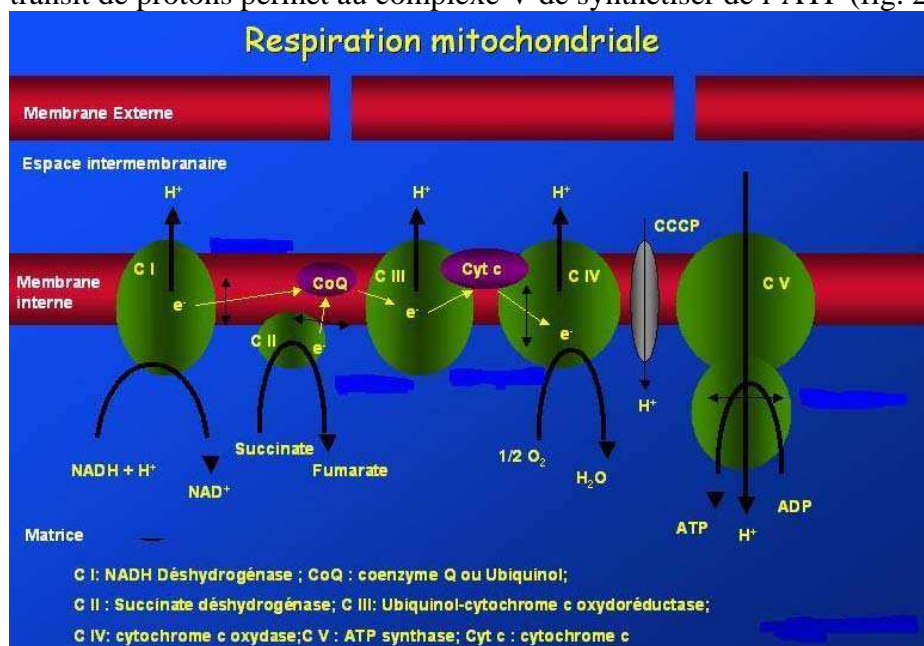


Fig. 28 :  
Mouvements des électrons dans la chaîne respiratoire.  
(<http://www.timo ne.univ- mrs.fr/medecine/ recherche/lab/ph arma/Mitochondr ie.htm>)

Ce processus, appelé phosphorylation oxydative, permet à la cellule de récupérer l'énergie des nutriments sous forme d'ATP, directement utilisable. Le rôle de l'ubiquinone est capital puisqu'il fait le lien entre les complexes I, II et III et transporte lui-même deux protons vers l'espace intermembranaire.

## 2. Acidification des lysosomes<sup>73</sup>

Une forme plus simple de conversion d'énergie est également basée sur les propriétés oxydo-réductrices de l'ubiquinone présente dans les membranes des lysosomes. Dans ce cas-ci, l'ubiquinol permet alors, par un jeu d'oxydo-réductions, le transfert de protons à l'intérieur de la vésicule. Ici, la production d'ATP est impossible puisque la membrane lysosomale ne contient pas d'ATP synthase. Cet apport de protons permet uniquement une acidification du milieu intra vésiculaire qui entraîne l'activation d'enzymes hydrolytiques dont le rôle est de digérer les débris cellulaires.

### D. Rôle physicochimique des quinones

Un autre rôle de l'ubiquinone, essentiel pour la cellule, est son activité antioxydante. En effet, la forme entièrement réduite de l'ubiquinone, l'ubiquinol, est considérée comme un antioxydant naturel et essentiel. A l'inverse d'autres antioxydants cellulaires, tels que le  $\beta$ -carotène ou l' $\alpha$ -tocophérol, son activité antioxydante est perpétuelle puisque son activité de transport de protons régénère la forme réduite et antioxydante<sup>74</sup>.

#### 1. L'ubiquinone existe sous différentes formes selon son état d'oxydation.

Malgré les deux formes prédominantes de l'ubiquinone dans l'organisme, à savoir la forme entièrement oxydée (UQ) et la forme entièrement réduite (UQH<sub>2</sub>), d'autres états rédox ou de protonation de faible durée de vie sont essentiels à son activité de transport d'électrons ainsi qu'à son activité antioxydante<sup>75</sup>. Ces différents états sont représentés dans la figure 29.

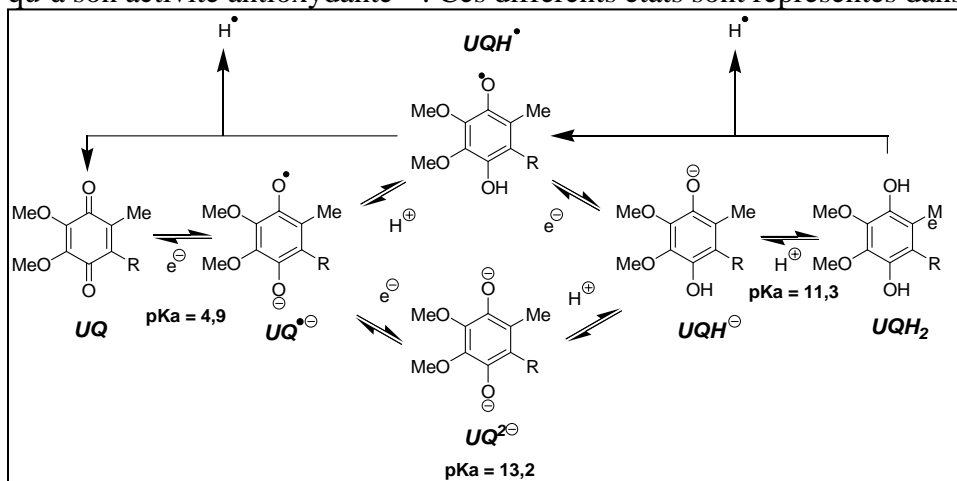
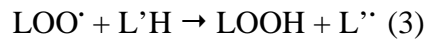
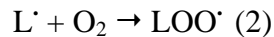
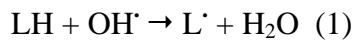


Fig. 29 :  
Différents états  
rédox de  
l'ubiquinone

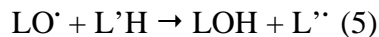
Les valeurs des pKa indiqués sur le schéma ont été mesurées dans un milieu eau/éthanol considéré comme un milieu proche de celui de la surface de la membrane interne mitochondriale. Parmi ces différents états représentés ci-dessus, la forme UQH<sub>2</sub> (ubiquinol) est la forme antioxydante par excellence. A l'inverse, le passage de UQH<sub>2</sub> à UQ suppose un intermédiaire ubisemiquinone (UQH<sup>•</sup>) fortement pro-oxydant.

## 2. Activité antioxydante de l'ubiquinol et de l'ubiquinone

L'ubiquinol UQH<sub>2</sub> a pour rôle principal d'éviter la peroxydation lipidique<sup>75,76</sup>. La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne initiée par l'abstraction d'un atome d'hydrogène (H<sup>•</sup>) d'un acide gras insaturé (LH) par un radical hydroxyle OH<sup>•</sup> (Equation 1). Le radical ainsi formé réagit rapidement avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxy (LOO<sup>•</sup>) (Equation 2) qui peut de nouveau retirer un atome d'hydrogène d'un autre acide gras insaturé (Equation 3).



Ce peroxyde lipidique peut à son tour se décomposer en présence de Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>+</sup> pour former un radical alkoxy (LO<sup>•</sup>) (Equation 4) qui peut à son tour retirer un atome d'hydrogène d'un acide gras insaturé. (Equation 5)



Le rôle de l'ubiquinol UQH<sub>2</sub> dans les membranes biologiques est d'éviter la peroxydation lipidique en réagissant avec les radicaux hydroxyles, peroxydes ou alkoxydes (Réaction 6)



Dans les membranes biologiques, l'ubiquinone existe sous ses deux formes UQH<sub>2</sub> et UQ. Il a été récemment postulé que la forme UQ possède également des propriétés antioxydantes indirectes. En effet, à l'inverse de UQH<sub>2</sub> qui piège directement les radicaux en s'oxydant lui-même, la forme UQ aurait un rôle de structurant membranaire. Il diminuerait ainsi la fluidité de cette membrane et éviterait l'interaction des radicaux hydroxyles avec les lipides membranaires.

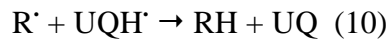
## 3. Activité pro-oxydante des formes UQH<sup>•</sup> / UQH<sup>-</sup> / UQ<sup>-</sup>

D'après la réaction (6), suite à la neutralisation de différents radicaux oxygénés par UQH<sub>2</sub>, nous notons l'apparition de la forme ubisemiquinone UQH<sup>•</sup>. L'évolution de la forme ubisemiquinone dans les milieux biologiques est à l'origine de l'apparition de molécules pro-

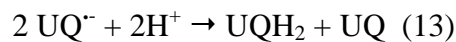
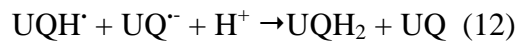
oxydantes<sup>75,77</sup> tels que les radicaux hydroperoxydes (Equation 7), hydroxydes (Equation 8), et alkoxydes (Equation 9).



Il est cependant à noter que, malgré cet effet pro-oxydant de l'ubisemiquinone, il existe des mécanismes de régulation permettant d'éviter l'apparition de ces radicaux. En effet, une autre issue pour le radical ubisemiquinone serait sa réaction avec un autre radical pour donner la forme UQ (Equation 10).



Alternativement, deux molécules d'ubisemiquinone peuvent réagir par « dismutation » pour donner une molécule d'ubiquinone et une molécule d'ubiquinol. Trois cas de figure sont possibles (Equations 11, 12 et 13) :

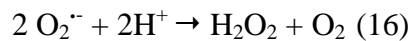


La réaction entre les deux anions (13) est très lente en raison de la répulsion électrostatique. Ce sont donc les réactions (11) et (12) qui prennent la relève. Ceci étant, dans les membranes biologiques, la réaction qui prédomine est la (11).

Les formes UQH<sup>·</sup> et UQ<sup>·-</sup> réagissent avec l'oxygène moléculaire pour former le radical anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>·-</sup> (Equations 14 et 15)



Le radical anion superoxyde ainsi formé est directement réduit par la **S**uperoxyde **D**ismutase (SOD) en milieu acide pour donner du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène (Equation 16).



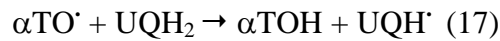
Il est intéressant de noter que les formes UQ ou UQH<sub>2</sub> ainsi obtenues sont de nouveau utilisées dans la chaîne respiratoire comme transporteur de protons et d'électrons.

L'effet antioxydant de l'ubiquinol doit donc être vu comme un ensemble de réaction pro- et anti-oxydantes sur lesquelles se greffent des systèmes de régulation indispensables à la neutralisation des radicaux.

#### 4. L'activité antioxydante de l'ubiquinol est jumelée à celle de l' $\alpha$ -tocophérol<sup>78</sup>

La vitamine E, ou  $\alpha$ -tocophérol, est souvent considérée comme un antioxydant majeur pour protéger les membranes biologiques de la peroxydation lipidique. Le radical  $\alpha$ -tocophéryle résultant est reconverti en  $\alpha$ -tocophérol par l'acide ascorbique. Un synergisme possible entre l'ubiquinol et la vitamine E en terme d'activité antioxydante serait donc concevable. En effet,

il a été postulé que l'ubiquinol en lui-même ne serait pas antioxydant en lui-même ; il exercerait son activité antioxydante en régénérant la forme active de la vitamine E de manière plus efficace que l'acide ascorbique. Cependant, des études portant sur la peroxydation lipidique générée par de l'ADP-Fe<sup>3+</sup> sur des membranes mitochondriales dépourvues de vitamine E indiquent que la seule présence d'ubiquinol est capable de neutraliser les radicaux ainsi formés. Ces expériences montrent bien l'effet antioxydant de l'ubiquinol lui-même. Il découle de cette étude que l'ubiquinol et l' $\alpha$ -tocophérol agissent de manière synergique<sup>75</sup>. En effet, l'ubiquinol est capable de régénérer l' $\alpha$ -tocophérol à partir du radical  $\alpha$ -tocophéryle ( $\alpha$ TO $\cdot$ ) (Equation 17) :



Il est aussi possible que l'ubisemiquinone réagisse directement avec le radical  $\alpha$ -tocophéryle pour régénérer l' $\alpha$ -tocophérol, réduisant ainsi davantage l'effet néfaste de ce premier (Equation 18) :



Par conséquent, l'ubiquinol prévient la peroxydation lipidique par voie directe en utilisant ses propriétés antioxydantes intrinsèques et par voie indirecte en régénérant la forme active de la vitamine E.

Le synergisme entre ces deux antioxydants n'est pas uniquement chimique, il est aussi géographique. En effet, d'après le coefficient de partage de l'ubiquinol et de l' $\alpha$ -tocophérol, il est concevable que l'ubiquinol se trouve en profondeur dans la bicouche lipidique et l' $\alpha$ -tocophérol, légèrement plus polaire, se trouve plus en surface. L'ubiquinol est légèrement moins polaire que l' $\alpha$ -tocophérol en raison des liaisons hydrogènes qui s'établissent entre les groupements hydroxyles et méthoxy du noyau (fig. 30).

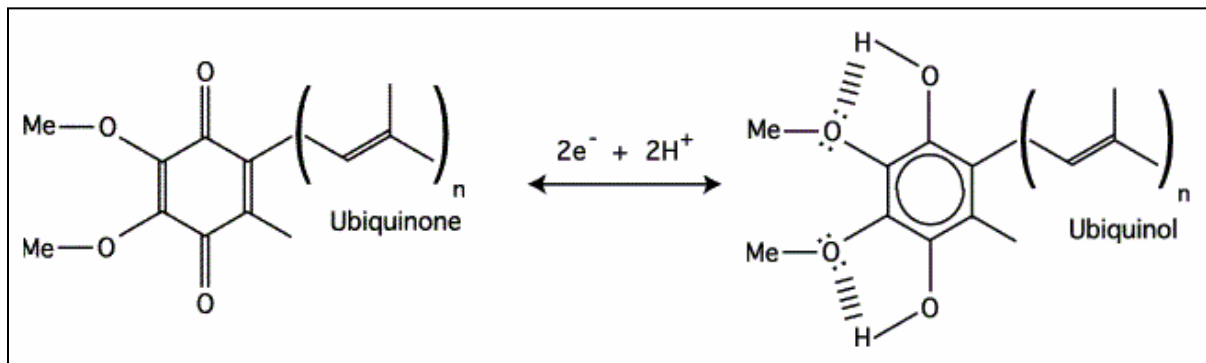


Fig. 30 : Les liaisons hydrogènes qui s'établissent entre les groupement hydroxyles et méthoxy de l'ubiquinol diminuent sa polarité.

Ainsi, ces deux composés constituent chacun une barrière chimique contre les radicaux se situant à deux niveaux différents de la bicouche phospholipidique.

## 5. Effet de la chaîne hydrophobe sur le pouvoir antioxydant

Il est démontré que la chaîne latérale hydrophobe n'a pas d'effet sur le pouvoir antioxydant de l'ubiquinol *in vitro*. A l'inverse, l'efficacité antioxydante contre la peroxydation lipidique *in vivo* diminue en fonction de la longueur de la chaîne<sup>70</sup>. En effet, il est démontré que les coenzymes Q portant des chaînes hydrophobes courtes sont de meilleurs antioxydants que leurs homologues à chaîne longue. Ceci s'explique par la mobilité des différents coenzymes Q dans la bicouche phospholipidique. Plus la chaîne hydrophobe est courte, plus le coenzyme Q est mobile et plus son mouvement intramembranaire est facilité lors des réactions d'oxydoréduction. Il est important aussi de noter que le coenzyme Q<sub>0</sub> n'exerce qu'une très faible activité antioxydante *in vivo*. Cette constatation traduit bien l'importance de la chaîne hydrophobe, et de l'intercalation de l'ubiquinol entre les phospholipides sur son pouvoir antioxydant.

## E. Quinones, SNC et maladies neurodégénératives

### 1. Constatations expérimentales

Il a été constaté une forte diminution de coenzyme Q<sub>10</sub> dans le cerveau de sujets âgés. Une administration orale de coenzyme Q<sub>10</sub> est capable de restaurer les quantités physiologiques. On le retrouve alors dans le cerveau, le cœur, le foie et le sang. Il faut notamment noter une forte augmentation de coenzyme Q<sub>10</sub> dans les mitochondries des cellules nerveuses.

### 2. Maladies neurodégénératives et coenzyme Q<sub>10</sub>

De nombreuses maladies neurodégénératives sont souvent associées à un stress oxydant ainsi qu'à une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire des mitochondries. Dans tous les cas, ceci va de pair avec une diminution de la concentration du coenzyme Q<sub>10</sub> dans les membranes mitochondriales<sup>79</sup>.

#### a. Maladie de Parkinson<sup>80</sup>

##### i. Caractéristiques cliniques

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative se manifestant en général chez l'homme de plus de 50 ans. Elle se traduit par un tremblement au repos, des troubles du tonus

et une akinésie, diversement associés. Elle affecte également l'élocution et le "langage corporel". Comme beaucoup d'autres troubles neurologiques, la maladie de Parkinson est chronique, évolutive et pour le moment incurable. Elle est d'étiologie inconnue.

## ii. Causes de la maladie

Une implication plus directe du dysfonctionnement mitochondrial dans la maladie de Parkinson a été mise en évidence après la découverte du MPTP (1-méthyl-4-phényl-1, 2, 3, 6-tétrahydropyridine) qui provoque un syndrome parkinsonien chez les humains, des primates non humains et des souris. Le mode d'action de cette molécule donne un indice sur une des causes possibles de la maladie de Parkinson. En effet, elle inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire des mitochondries. Une étude du fonctionnement mitochondrial de sujets atteints prouve que le complexe I voit son activité diminuer par rapport à celui de mitochondries saines.

Si le dysfonctionnement mitochondrial est à l'origine de la maladie de Parkinson, il devrait pouvoir être mis en évidence auprès des sujets présentant des signes précoces de la maladie. Shultz et Hass<sup>81</sup> ont montré une diminution significative de l'activité des complexes mitochondriaux I et III chez les malades précoces.

Il a été avancé que le dysfonctionnement mitochondrial serait dû à des dommages oxydants qui conduiraient à des mutations de l'ADN mitochondrial. De telles mutations seraient à l'origine du mauvais fonctionnement des complexes I et III. Nous nous retrouvons alors dans un cercle vicieux où la génération de radicaux libres par la chaîne respiratoire serait elle-même à l'origine des dommages causés sur cette dernière.

## iii. Rôle du coenzyme Q<sub>10</sub>

Le coenzyme Q<sub>10</sub>, comme décrit précédemment, se retrouve sur la membrane interne des mitochondries. Son rôle antioxydant serait, dans le cas de la maladie de Parkinson, d'une importance majeure puisqu'il aurait un rôle protecteur de la mitochondrie elle-même. En effet, des études ont montré que chez les sujets malades, la quantité de coenzyme Q<sub>10</sub> est diminuée de 33% dans les membranes mitochondriales par rapport à des sujets sains. Ceci n'est pourtant pas le cas pour le sérum. Un apport nutritionnel en coenzyme Q<sub>10</sub> serait bénéfique pour la protection de la chaîne respiratoire des mitochondries ainsi que de l'ADN mitochondrial. Cependant, un apport excessif de coenzyme Q<sub>10</sub> serait pour l'instant déconseillé puisque des études cliniques plus poussées n'ont pas encore été réalisées.



b. Maladie de Huntington <sup>79</sup>

i. Caractéristiques cliniques

La Chorée de Huntington est une maladie progressive et neurodégénérative, autosomale et dominante. Elle est due à une répétition de la séquence trinuécléotidique CAG dans le gène *huntingtin*. Les manifestations cliniques de la maladie sont une chorée, un déclin cognitif et des problèmes comportementaux. La dégénération d'une population neuronale bien précise dite « medium spiny » du striatum est également à noter.

ii. Causes de la maladie

Des études sur la fonction mitochondriale indiquent une diminution de l'activité des complexes II et III de la chaîne respiratoire ainsi qu'une diminution moins marquée de l'activité du complexe IV.

iii. Rôle du coenzyme Q<sub>10</sub>

Le lien avec le coenzyme Q<sub>10</sub> dans la chorée de Huntington n'est pas encore clair. Ceci étant, il est démontré que l'administration de coenzyme Q<sub>10</sub> à des modèles de souris malades, augmente leur survie.

c. Sclérose Latérale Amyotrophique (ALS) <sup>79</sup>

i. Caractéristiques cliniques

La sclérose latérale amyotrophique est une maladie neurodégénérative liée à l'altération progressive des neurones moteurs, les cellules qui commandent les muscles volontaires. La maladie se déclare entre 45 et 75 ans. C'est une affection handicapante à aggravation progressive, dont l'évolution moyenne est d'environ 36 mois.

ii. Causes de la maladie

Encore une fois, le stress oxydatif serait à l'origine de cette maladie. La présence des radicaux libres serait à l'origine de la mort neuronale observée, probablement par une atteinte des membranes neuronales ainsi que d'une atteinte de l'ADN

iii. Rôle du coenzyme Q<sub>10</sub>

Dans ce cas, l'administration de coenzyme Q<sub>10</sub> ne prolongerait que très modestement l'espérance de vie des modèles animaux. Des études supplémentaires sont nécessaires pour valider ces résultats.

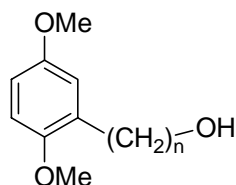
#### IV. CADRE DU TRAVAIL

L'intérêt porté aux mimétiques des facteurs neurotrophiques pouvant induire une différenciation ou une régénération d'un axone au sein de la cicatrice gliale a été la force motrice de ce travail de thèse. La présence de radicaux libres au sein même de la cicatrice gliale, générés par la microglie activée, rend l'aspect antioxydant de ces composés très important.

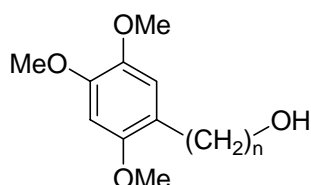
Mon travail a consisté à :

- étudier les propriétés biologiques et physicochimiques du tCFA15. Ces résultats seront présentés dans le chapitre 1.
- Synthétiser de nouveaux composés plus antioxydants que le tCFA15 tout en maintenant la propriété biologique. Nous avons ainsi synthétisé 5 séries de molécules jumelant l'activité antioxydante du noyau hydroquinonique perméthylé (stables à l'oxydation) et les propriétés neurotrophiques de la chaîne  $\omega$ -alcanol. Ces produits s'appellent les « **Quinol Fatty Alcohols** » ou **QFA**.

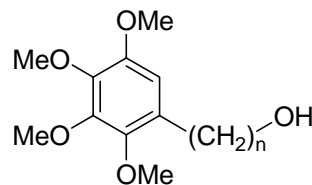
## Introduction générale



**QFA**

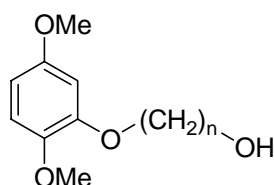


**Q<sub>3</sub>FA**

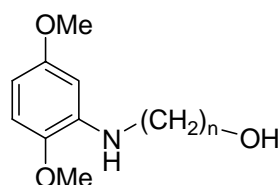


**Q<sub>4</sub>FA**

n = 12, 14, 15, 16, 18



**O-QFA**



**N-QFA**

n = 10, 12, 14, 16

Ces résultats seront exposés dans les chapitres 2 et 3.

Suite à l'activité biologique très intéressante observée pour l'un des produits synthétisés, le QFA15, j'ai essayé d'adapter cette synthèse sur support solide. Ceci permettra :

- de synthétiser le produit désiré en s'affranchissant des étapes de purification souvent fastidieuses
- l'accès à d'autres molécules à travers la synthèse parallèle, en couplant d'autres cycles antioxydants ou ayant des propriétés pharmacologiques intéressantes, sur une même chaîne  $\omega$ -alcanol et ce dans l'optique de trouver de nouveaux « hits » (Chapitre 4).

Enfin, en vue d'étudier une nouvelle activité biologique intéressante, j'ai synthétisé un dérivé du QFA15 à travers un réactif supporté où l'alcool terminal est remplacé par un acide hydroxamique. Les acides hydroxamiques sont de puissants chélateurs de métaux et, de ce fait de puissants inhibiteurs d'une famille d'enzymes appelées « métalloprotéases matricielles » impliqués dans de nombreuses pathologies telles que l'arthrose<sup>82</sup>, la métastase des tumeurs<sup>83</sup> et la sclérose en plaques<sup>84</sup>(Chapitre 4).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Braak, H.; Braak, E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* **1998**, *53*, 127-140.
- (2) Verbeek, M. M.; Ruiten, D. J.; de Waal, R. M. The role of amyloid in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 937-950.
- (3) Imahori, K.; Hoshi, M.; Ishiguro, K.; Sato, K.; Takahashi, M. et al. Possible role of tau protein kinases in pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **1998**, *19*, S93-98.
- (4) Combs, C. K.; Johnson, D. E.; Cannady, S. B.; Lehman, T. M.; Landreth, G. E. Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 928-939.
- (5) Quintanilla, R. A.; Orellana, D. I.; Gonzalez-Billault, C.; Maccioni, R. B. Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp. Cell Res.* **2004**, *295*, 245-257.
- (6) Kim, H. J.; Ifergan, I.; Antel, J. P.; Seguin, R.; Duddy, M. et al. Type 2 monocyte and microglia differentiation mediated by glatiramer acetate therapy in patients with multiple sclerosis. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 7144-7153.
- (7) Bryson, H. M.; Benfield, P. Donepezil. *Drugs Aging* **1997**, *10*, 234-239.
- (8) Enz, A.; Amstutz, R.; Boddeke, H.; Gmelin, G.; Malanowski, J. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. *Prog. Brain Res.* **1993**, *98*, 431-438.
- (9) Dovey, H. F.; John, V.; Anderson, J. P.; Chen, L. Z.; de Saint Andrieu, P. et al. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J. Neurochem.* **2001**, *76*, 173-181.
- (10) Aisen, P. S.; Davis, K. L.; Berg, J. D.; Schafer, K.; Campbell, K. et al. A randomized controlled trial of prednisone in Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Cooperative Study. *Neurology* **2000**, *54*, 588-593.
- (11) Mulder, D. W.; Kurland, L. T.; Offord, K. P.; Beard, C. M. Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **1986**, *36*, 511-517.
- (12) Rosen, D. R. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **1993**, *364*, 362.
- (13) Choi, D. W. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* **1992**, *23*, 1261-1276.
- (14) Leigh, P. N.; Meldrum, B. S. Excitotoxicity in ALS. *Neurology* **1996**, *47*, S221-227.
- (15) Sathasivam, S.; Ince, P. G.; Shaw, P. J. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2001**, *27*, 257-274.
- (16) Appel, S. H.; Smith, R. G.; Engelhardt, J. I.; Stefani, E. Evidence for autoimmunity in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **1993**, *118*, 169-174.
- (17) Bensimon, G.; Lacomblez, L.; Delumeau, J. C.; Bejuit, R.; Truffinet, P. et al. A study of riluzole in the treatment of advanced stage or elderly patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* **2002**, *249*, 609-615.
- (18) Gredal, O.; Werdelin, L.; Bak, S.; Christensen, P. B.; Boysen, G. et al. A clinical trial of dextromethorphan in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* **1997**, *96*, 8-13.
- (19) Jackson, P. F.; Slusher, B. S. Design of NAALADase inhibitors: a novel neuroprotective strategy. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 949-957.
- (20) Iwasaki, Y.; Shiojima, T.; Kinoshita, M.; Ikeda, K. SR57746A: a survival factor for motor neurons in vivo. *J. Neurol. Sci.* **1998**, *160 Suppl 1*, S92-96.

- (21) Fischer, W.; Victorin, K.; Bjorklund, A.; Williams, L. R.; Varon, S. et al. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature* **1987**, *329*, 65-68.
- (22) Thoenen, H.; Sendtner, M. Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat. Neurosci.* **2002**, *5 Suppl*, 1046-1050.
- (23) Omura, S.; Fujimoto, T.; Ootoguro, K.; Matsuzaki, K.; Moriguchi, R. et al. Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1991**, *44*, 113-116.
- (24) Kakeya, H.; Onozawa, C.; Sato, M.; Arai, K.; Osada, H. Neuritogenic effect of epolactaene derivatives on human neuroblastoma cells which lack high-affinity nerve growth factor receptors. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 391-394.
- (25) Avramut, M.; Zeevi, A.; Achim, C. L. The immunosuppressant drug FK506 is a potent trophic agent for human fetal neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **2001**, *132*, 151-157.
- (26) Borg, J.; Toazara, J.; Hietter, H.; Henry, M.; Schmitt, G. et al. Neurotrophic effect of naturally occurring long-chain fatty alcohols on cultured CNS neurons. *FEBS Lett.* **1987**, *213*, 406-410.
- (27) Keyling-Gilger, F.; Schmitt, G.; Beck, A.; Luu, B. Synthesis of optically active diastereomers of a non proteic neurotrophic mimetic. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 14891-14904.
- (28) Takeuchi, R.; Murase, K.; Furukawa, Y.; Furukawa, S.; Hayashi, K. Stimulation of nerve growth factor synthesis/secretion by 1,4-benzoquinone and its derivatives in cultured mouse astroglial cells. *FEBS Lett.* **1990**, *261*, 63-66.
- (29) Girlanda-Junges, C.; Keyling-Bilger, F.; Schmitt, G.; Luu, B. Effect of cyclohexenonic long chain fatty alcohols on neurite outgrowth. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7735-7748.
- (30) Gonzalez de Aguilar, J. L.; Girlanda-Junges, C.; Coowar, D.; Duportail, G.; Loeffler, J. P. et al. Neurotrophic activity of 2,4,4-trimethyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexen-1-one in cultured central nervous system neurons. *Brain Res.* **2001**, *920*, 65-73.
- (31) Schwartz, M.; Yoles, E.; Levin, L. A. 'Axogenic' and 'somagenic' neurodegenerative diseases: definitions and therapeutic implications. *Mol. Med. Today* **1999**, *5*, 470-473.
- (32) Gaillard, S.; Nasarre, C.; Gonthier, B.; Bagnard, D. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la croissance axonale. *Rev. Neurol. (Paris)* **2005**, *161*, 153-172.
- (33) Jablonka, S.; Wiese, S.; Sendtner, M. Axonal defects in mouse models of motoneuron disease. *J Neurobiol* **2004**, *58*, 272-286.
- (34) Suter, D. M.; Forscher, P. Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J. Neurobiol.* **2000**, *44*, 97-113.
- (35) Luo, L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* **2000**, *1*, 173-180.
- (36) Perry, V. H.; Gordon, S. Macrophages and the nervous system. *Int. Rev. Cytol.* **1991**, *125*, 203-244.
- (37) Kreutzberg, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* **1996**, *19*, 312-318.
- (38) Levine, J. M. Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 4716-4730.
- (39) Johansson, C. B.; Momma, S.; Clarke, D. L.; Risling, M.; Lendahl, U. et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* **1999**, *96*, 25-34.

- (40) Fawcett, J. W. Axon growth and regeneration : Intrinsic neuronal effects. *Trends Neurosci.* **1992**, *15*, 5-8.
- (41) Berry, M.; Maxwell, W. L.; Logan, A.; Mathewson, A.; McConnell, P. et al. Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)* **1983**, *32*, 31-53.
- (42) Davies, S. J.; Field, P. M.; Raisman, G. Regeneration of cut adult axons fails even in the presence of continuous aligned glial pathways. *Exp. Neurol.* **1996**, *142*, 203-216.
- (43) Neugebauer, K. M.; Tomaselli, K. J.; Lilien, J.; Reichardt, L. F. N-cadherin, NCAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro. *J. Cell Biol.* **1988**, *107*, 1177-1187.
- (44) Fawcett, J. W.; Housden, E.; Smith-Thomas, L.; Meyer, R. L. The growth of axons in three-dimensional astrocyte cultures. *Dev. Biol.* **1989**, *135*, 449-458.
- (45) McGee, A. W.; Strittmatter, S. M. The Nogo-66 receptor: focusing myelin inhibition of axon regeneration. *Trends Neurosci.* **2003**, *26*, 193-198.
- (46) Lewis, C. E.; McGee, J. O. The macrophage. *Oxford: Oxford University Press* **1992**, 1-57.
- (47) Rabchevsky, A. G.; Streit, W. J. Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J. Neurosci. Res.* **1997**, *47*, 34-48.
- (48) Levine, J. M.; Nishiyama, A. The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells. *Perspect. Dev. Neurobiol.* **1996**, *3*, 245-259.
- (49) GrandPre, T.; Li, S.; Strittmatter, S. M. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* **2002**, *417*, 547-551.
- (50) Wang, K. C.; Koprivica, V.; Kim, J. A.; Sivasankaran, R.; Guo, Y. et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* **2002**, *417*, 941-944.
- (51) Pindzola, R. R.; Doller, C.; Silver, J. Putative inhibitory extracellular matrix molecules at the dorsal root entry zone of spinal cord during development and after root and sciatic nerve lesion. *Dev. Biol.* **1993**, *156*, 34-48.
- (52) Margolis, R. K.; Rauch, U.; Maurel, P.; Margolis, R. U. Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect. Dev. Neurobiol.* **1996**, *3*, 273-290.
- (53) McKeon, R. J.; Schreiber, R. C.; Rudge, J. S.; Silver, J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J. Neurosci.* **1991**, *11*, 3398-3411.
- (54) He, Z.; Wang, K. C.; Koprivica, V.; Ming, G.; Song, H. J. Knowing how to navigate: mechanisms of semaphorin signaling in the nervous system. *Sci. STKE* **2002**, *2002*, RE1.
- (55) Pasterkamp, R. J.; Verhaagen, J. Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **2001**, *35*, 36-54.
- (56) Gavazzi, I. Semaphorin-neuropilin-1 interactions in plasticity and regeneration of adult neurons. *Cell Tissue Res.* **2001**, *305*, 275-284.
- (57) Fournier, A. E.; GrandPre, T.; Strittmatter, S. M. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* **2001**, *409*, 341-346.
- (58) Yamashita, T.; Higuchi, H.; Tohyama, M. The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J. Cell Biol.* **2002**, *157*, 565-570.
- (59) Wang, K. C.; Kim, J. A.; Sivasankaran, R.; Segal, R.; He, Z. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* **2002**, *420*, 74-78.

- (60) Filbin, M. T. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 703-713.
- (61) Fournier, A. E.; Takizawa, B. T.; Strittmatter, S. M. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 1416-1423.
- (62) Igarashi, M.; Strittmatter, S. M.; Vartanian, T.; Fishman, M. C. Mediation by G-proteins of signals that cause collapse of growth cones. *Science* **1993**, *259*, 77-79.
- (63) Bandtlow, C. E.; Schmidt, M. F.; Hassinger, T. D.; Schwab, M. E.; Kater, S. B. Role of intracellular calcium in NI-35-evoked collapse of neuronal growth cones. *Science* **1993**, *259*, 80-83.
- (64) Kolodkin, A. L.; Levengood, D. V.; Rowe, E. G.; Tai, Y. T.; Giger, R. J. et al. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* **1997**, *90*, 753-762.
- (65) Winberg, M. L.; Noordermeer, J. N.; Tamagnone, L.; Comoglio, P. M.; Spriggs, M. K. et al. Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* **1998**, *95*, 903-916.
- (66) Raper, J. A. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2000**, *10*, 88-94.
- (67) Castellani, V.; Chedotal, A.; Schachner, M.; Faivre-Sarrailh, C.; Rougon, G. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Semaphorin 3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* **2000**, *27*, 237-249.
- (68) Tuttle, R.; O'Leary, D. D. Neurotrophins rapidly modulate growth cone response to the axon guidance molecule, collapsin-1. *Mol. Cell Neurosci.* **1998**, *11*, 1-8.
- (69) Zanata, S. M.; Hovatta, I.; Rohm, B.; Puschel, A. W. Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 471-477.
- (70) Albano, C. B.; Muralikrishnan, D.; Ebadi, M. Distribution of coenzyme Q homologues in brain. *Neurochem. Res.* **2002**, *27*, 359-368.
- (71) Bloch, K. Sterol molecule : structure, biosynthesis and function. *Steroids* **1992**, *57*, 378-383.
- (72) Ernster, L.; Dallner, G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1271*, 195-204.
- (73) Crane, F. L. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J. Am. Coll. Nutr.* **2001**, *20*, 591-598.
- (74) Frei, B.; Kim, M. C.; Ames, B. N. Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1990**, *87*, 4879-4883.
- (75) James, A. M.; Smith, R. A.; Murphy, M. P. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *423*, 47-56.
- (76) Nohl, H.; Gille, L.; Kozlov, A. V. Antioxidant-derived prooxidant formation from ubiquinol. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *25*, 666-675.
- (77) Niki, E. Mechanisms and dynamics of antioxidant action of ubiquinol. *Mol. Aspects Med.* **1997**, *18 Suppl*, S63-70.
- (78) Cadenas, E.; Hochstein, P.; Ernster, L. Pro- and antioxidant functions of quinones and quinone reductases in mammalian cells. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1992**, *65*, 97-146.
- (79) Shults, C. W. Coenzyme Q10 in neurodegenerative diseases. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1917-1921.
- (80) Shults, C. W. Mitochondrial dysfunction and possible treatments in Parkinson's disease-a review. *Mitochondrion* **2004**, *4*, 641-648.

- (81) Hass, R.; Nasirian, F.; Nakano, K.; Ward, D.; Pay, M. et al. Low platelet mitochondrial Complex I and Complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **1995**, *37*, 714-722.
- (82) Firestein, G. S.; Paine, M. M.; Littman, B. H. Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases, complement, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. Quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids. *Arthritis Rheum.* **1991**, *34*, 1094-1105.
- (83) Pyke, C.; Ralfkiaer, E.; Huhtala, P.; Hurskainen, T.; Dano, K. et al. Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 1336-1341.
- (84) Gijbels, K.; Galardy, R. E.; Steinman, L. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteases. *J Clin Invest* **1994**, *94*, 2177-2182.



Chapitre I :  
Synthèse et étude  
du tCFA15

## I. INTRODUCTION

Nous avons décrit précédemment que le SNC adulte est incapable de régénérer les extensions axonales suite à une lésion. Ceci est dû à la formation, *post trauma*, d'une cicatrice gliale qui recrute tout un panel de cellules neurales. Ces cellules surexpriment une grande quantité de molécules parmi lesquelles la Sema3A et les protéines de myéline (Nogo A, MAG, OMgp). Ces substances sont très fortement inhibitrices de la régénération axonale en interagissant avec des récepteurs localisés sur le cône de croissance de l'axone.

Dans cette étude, nous montrons que le tCFA15 (3-(15-hydroxypentadécyl)-2,4,4-triméthylcyclohexène-2-one), un cyclohexénone contenant une longue chaîne hydrocarbonée à 15 atomes de carbone, est capable de promouvoir une croissance axonale en milieu inhibiteur c'est à dire en présence de Sema3A ou de myéline.

- II. PUBLICATION : « Counteraction of axonal growth inhibitory properties of Semaphorin 3A and myelin-associated proteins by a synthetic neurotrophic compound »**  
**M. Hanbali, F. Bernard et al. *J. Neurochem.*, 2004, 90, 1423-1431.**

# Counteraction of axonal growth inhibitory properties of Semaphorin 3A and myelin-associated proteins by a synthetic neurotrophic compound

Mazen Hanbali,\*†<sup>1</sup> Frédéric Bernard,\*<sup>1</sup> Caroline Berton,\* Gilles Gatineau,\* Martine Perraut,\* Dominique Aunis,\* Bang Luu† and Dominique Bagnard\*

\*INSERM U575, Physiopathologie du Système Nerveux, Centre de Neurochimie and †CNRS-ULP UMR7123, Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles, Centre de Neurochimie, Strasbourg, France

## Abstract

One of the reasons for the lack of nerve regeneration in the CNS is the formation of a glial scar over-expressing multiple inhibitory factors including myelin-associated proteins and members of the Semaphorin family. Innovative therapeutic strategies must stimulate axon extension across the lesion site despite this inhibitory molecular barrier. We recently developed a synthetic neurotrophic compound combining an  $\omega$ -alkanol with a retinol-like cycle (3-(15-hydroxy-pentadecyl)-2,4,4-trimethyl-cyclohexen-2-one (tCFA15)). Here, we demonstrate that tCFA15 is able to promote cortical axon out-

growth *in vitro* even in the presence of the inhibitory Semaphorin 3A and myelin extracts. This growth-promoting effect is selectively observed in axons and requires multiple growth-associated intracellular pathways. Our results illustrate the potential use of synthetic neurotrophic compounds to promote nerve regeneration by counteracting the axonal growth inhibition triggered by glial scar-associated inhibitory factors.

**Keywords:** axon, cortex, myelin, neurotrophic factor, regeneration, Semaphorin.

*J. Neurochem.* (2004) **90**, 1423–1431.

Adult mammalian brain and spinal cord have limited capacity for regeneration. This makes the repair of any injuries hazardous and, consequently, CNS traumas are devastating. Intrinsically, CNS neurones are able to regenerate their injured axons when exposed to appropriate extracellular signals (Gurgo *et al.* 2002). Nevertheless, as reviewed by Schwab and colleagues (Fouad *et al.* 2001), a lack of expression of both growth-associated proteins that are expressed during development and neurotrophic factors which mediate cell survival is generally observed during CNS lesions. Moreover, the formation of the glial scar constitutes a mechanical barrier blocking nerve regeneration. The inhibition of nerve re-growth is also the consequence of the expression of many factors, such as myelin-associated proteins (Nogo and MAG), chondroitin sulphate proteoglycans or Semaphorins, that all possess strong inhibitory properties for growing axons. Accordingly, various strategies have been used to promote nerve regeneration (Fouad *et al.* 2001; Gimenez y Ribotta *et al.* 2002; Schwab 2002). One of these strategies is to provide neurotrophic compounds within the lesion site in order to improve neurone survival, sprouting and axon re-growth (Schnell *et al.* 1994; Tuszynski *et al.* 1997; Liu *et al.* 1999; Ramer *et al.* 2000).

Nevertheless, the major problems in applying neurotrophic factors are their poor nervous system penetration, relative instability and wide range of local and systemic biological activities (Xie and Longo 2000). To address these limitations, a suitable approach consists of developing small molecules which are able to mimic the biological effects of the naturally occurring proteic factors. Initial investigations, based on the screening of medicinal plants to look for a lead compound, showed that hexacosanol, a long-chain  $\omega$ -alkanol, possesses neurotrophic effects. Several chemical modifications, such as the combination of the partial structure of  $\omega$ -alkanol and that of retinol, were performed to improve the physicochemical

Received February 26, 2004; revised manuscript received April 13, 2004; accepted May 17, 2004.

Address correspondence and reprint requests to Dr D. Bagnard, INSERM U575, Physiopathologie du Système Nerveux, Centre de Neurochimie, 5 Rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France.

E-mail: bagnard@neurochem.u-strasbg.fr

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this article.

**Abbreviations used:** EGCG, epigallocatechin gallate; PBS, phosphate-buffered saline; Sema3A, Semaphorin 3A; tCFA15, 3-(15-hydroxy-pentadecyl)-2,4,4-trimethyl-cyclohexen-2-one.

properties and the biological effect (Girlanda-Junges *et al.* 2000). Hence, we were able to identify an effect on neurite outgrowth on mice foetal neurones at  $10^{-7}$  M (Gonzalez de Aguilar *et al.* 2001). One central issue in developing this synthetic neurotrophic compound towards a new therapeutic strategy is the proof that its biological activity is maintained in the presence of inhibitory molecules. Among these factors, members of the Semaphorin family, guidance molecules providing inhibitory signals preventing axon extension, are up-regulated in the newly formed glial scar (Fournier and Strittmatter 2001; Pasterkamp and Verhaagen 2001; De Winter *et al.* 2002). Myelin-associated proteins, including Nogo and MAG, are also responsible for the lack of nerve regeneration (Fournier and Strittmatter 2001). Hence, an essential prerequisite for axon re-growth is to overcome this inhibitory environment by stimulating axon extension despite negative forces. Here, we show that tCFA15, a cyclohexenoic long chain  $\omega$ -alkanol, possesses a specific growth-promoting effect for cortical axons and that this growth-promoting effect counteracts the inhibitory properties of Semaphorin 3A (Sema3A) and myelin proteins. Therefore, it is the first demonstration that synthetic neurotrophic compounds could be used as potential chemicals to promote nerve outgrowth by counteracting the inhibitory capacity of some glial scar-associated growth inhibitory factors.

## Materials and methods

### Culture of CNS neurones

Foetal mouse cerebral hemispheres (15 days old) were dissected in cold Gey's balanced salt solution supplemented with glucose in order to isolate neocortex. Cells were dispersed by trypsin and mechanical dissociation. They were then plated at a density of 200 000 cells/well on glass cover-slips coated with 1  $\mu$ g/mL poly-L-lysine and incubated for 24 h at 37°C over 5% CO<sub>2</sub> in a serum-containing medium (Dulbecco's modified Eagle's medium, glutamine 2 mM, 1 g/L glucose, 10% foetal calf serum, penicillin/streptomycin, all from Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

On day 2, the medium was replaced by a defined medium (Dulbecco's modified Eagle's medium, 2 mM glutamine, 1 g/L glucose, 16  $\mu$ g/mL putrescine, 52 ng/mL selenium, holo-transferrin 10  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ g/mL insulin and 3 ng/mL progesterone, all from Sigma, St Louis, MO, USA) and the testing compounds added at different concentrations. Cells were again incubated for 24 h at 37°C over 5% CO<sub>2</sub>.

### Immunocytochemical staining and morphometric analysis

On day 3, cells were fixed with 4% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min. After two washes with PBS, the permeation of cells was performed with 100% methanol for 5 min. After five washes with PBS, cells were stained with an anti-phospho-neurofilament antibody (Smi312, Sternberger Monoclonal, Lutherville, MD, USA) diluted 1/400 in PBS-bovine serum albumin (3%) for 2 h. Several washes with PBS were then followed by a secondary immunostaining with Alexa488-coupled antibody diluted 1/200 in

PBS for 45 min in the dark. After two final washes with PBS, plates were washed with water and mounted with aqua-polymount.

The actin cytoskeleton was visualized by a one-step fixation, permeabilization and staining process consisting of the addition of 4% formaldehyde with rhodamine phalloidin (10 units; R-415, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 20 min.

Randomly selected photographs were taken ( $\times 20$  magnification) using an Axiovert 200 microscope (Zeiss France, Le Pecq, France) equipped with a digital camera (CoolSnap fx, Roper Scientific, Evry, France). For each neurone, both axonal and dendrite length were determined using a computer-assisted image analyser (UTHSCSA Image Tool 3.0). A minimum of 20 fields (containing 10–20 neurones) was analysed for each experimental condition.

### Preparation of Semaphorin and myelin substrates

Human embryonic kidney 293 cells (ATCC CRL 1573) expressing Sema3A were used as a source of Sema3A [Flag-His-Sema3A (Adams *et al.* 1997), cell line 602.108]. Cells were cultured in MEM containing 5000 u/mL penicillin, 5 mg/mL streptomycin, 200 mM L-glutamine, 10% foetal calf serum and 1 mg/mL G418 (Invitrogen). The Sema3A was purified from conditioned medium using an anti-flag M2 affinity gel (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) as previously described (Bagnard *et al.* 2001b). Purified Sema3A (100 ng/mL) was directly added to the culture medium in order to provoke growth cone collapse and axon retraction (Bagnard *et al.* 1998, 2001a,b). Myelin extracts were obtained from crude myelin isolated from a 5% adult brain homogenate in 0.32 M sucrose by density-gradient centrifugation on a step of 0.82 M sucrose. Myelin was water-shocked and centrifuged twice at low speed, lyophilized and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for further use (Norton and Poduslo 1973). Myelin extract solution was prepared by re-hydrating in PBS. The solution was homogenized, sonicated and protein content determined by the Bradford method. The stock solution consisted of 7.6 mg/mL total proteins obtained from 20 mg lyophilized myelin in 1 mL PBS.

### Signalling pathway inhibitors

Tyrosine kinase, cyclin-dependent protein kinase, serine/threonine kinase, ERK1/2 and p38 MAPK, oxidoreductase, adenylate and guanylate cyclase were blocked, respectively, by two general inhibitors of tyrosine kinase, genistein (4',5,7-trihydroxy isoflavone; 345838, Calbiochem, San Diego, CA, USA) and lavendustin A (428150, Calbiochem), olomoucine (2-[2-hydroxyethylamino]-6-benzylamino-9-methylpurine; 494620, Calbiochem), LiCl, 2'-amino-3'-methoxyflavone (513000, Calbiochem), 4-[4-fluorophenyl]-2-[4-hydroxyphenyl]-5-[4-pyridyl]-1H-imidazole (559388), epigallocatechin gallate (EGCG; E4143, Sigma), *cis-N*-(2-phenylcyclopentyl)-azacyclotridec-1-en-2-amine hydrochloride (M-182, Sigma) and 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (03636, Sigma). Inhibitors were used at concentrations of 1  $\mu$ M [olomoucine, lavendustine, EGCG and *cis-N*-(2-phenylcyclopentyl)-azacyclotridec-1-en-2-amine hydrochloride], 10  $\mu$ M (genistein, 2'-amino-3'-methoxyflavone, 4-[4-fluorophenyl]-2-[4-hydroxyphenyl]-5-[4-pyridyl]-1H-imidazole and 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) or 1 mM (LiCl). These concentrations were those producing a maximal effect in our model. It is important to note that, due to cell toxicity, it was not possible to work with higher concentrations in the case of olomoucine, lavendustine, EGCG, *cis-N*-(2-phenylcyclopentyl)-azacyclotridec-1-en-2-amine hydrochloride and LiCl.

### Western blot analysis

Cortical neurones were grown in the presence of Sema3A, tCFA15 ( $10^{-7}$  M) or Sema3A + tCFA15 ( $10^{-7}$  M) or for 24 h. The culture medium was removed, the cells washed with PBS, collected using a cell scraper and centrifuged at room temperature for 5 min at 1000 g. The pellet was suspended in lysis buffer [150 mM NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulphate, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate] and frozen for 5 min at  $-20^{\circ}\text{C}$  before sonication for 30 s. The protein content was determined using the Bradford method, the samples electrophoresed on sodium dodecyl sulphate gels (4–16% gradient) and electro-transferred to a nitrocellulose membrane. After transfer, the membrane was washed for 5 min at room temperature in TBS-Tween and blocked for 1 h in Tris buffer containing 0.1% Tween 20 and 5% bovine serum albumin. The blots were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with gentle agitation with the primary antibody anti-phospho-Cdc2 (Tyr15, 1/1000; 9111, Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA), rinsed and washed to be incubated for 2 h at room temperature with ImmunoPure Protein A/G peroxidase conjugated (32490, Pierce, Rockford, IL, USA). Bound antibodies were detected using an ECL western blotting kit (34076, Pierce). The relative optical density of the blots was determined using Image Tool (UTHSCSA Image Tool 3.0).

### Test substances

The tCFA15 was synthesized in the Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles UMR7123 (CNRS-ULP, Strasbourg, France) as described previously (Girlanda-Junges *et al.* 2000). It was then dissolved in ethanol and diluted to a final concentration of 0.1% ethanol. Control cells were incubated under the same conditions.

### Statistics

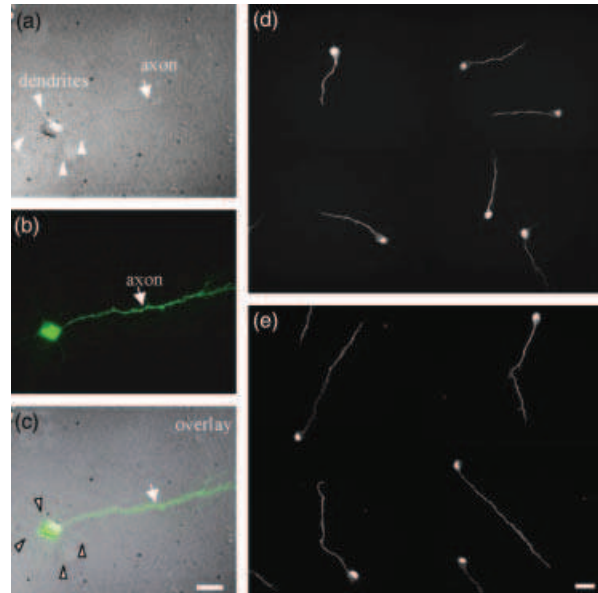
Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Student's *t*-test (KyPlot version 2.0 beta 13). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . Each experimental condition was tested in at least three independent experiments and analysed by two different people in blind conditions.

The statistical analysis of rhodamine phalloidin staining was performed using a  $\chi^2$  test.

## Results

### tCFA15 stimulates cortical axon outgrowth

To determine the effect of tCFA15 on axonal growth, cortical neurones were incubated with increasing concentrations of tCFA15 ranging from  $10^{-12}$  to  $10^{-7}$  M. Axons were identified by immunostaining of the phosphorylated form of neurofilament (Figs 1a–c). In control conditions, axons extended over 70  $\mu\text{m}$  after 2 days in culture. Strikingly, the addition of tCFA15 induced a significant 60–70% increase of axonal growth that reached 125–130  $\mu\text{m}$  (Figs 1d and e;  $P < 0.05$ , student's *t*-test,  $n = 133$ ). As described in Fig. 2(a), this growth-promoting effect was dose dependent with a maximal effect obtained with 0.1  $\mu\text{M}$  tCFA15. In this model, it is

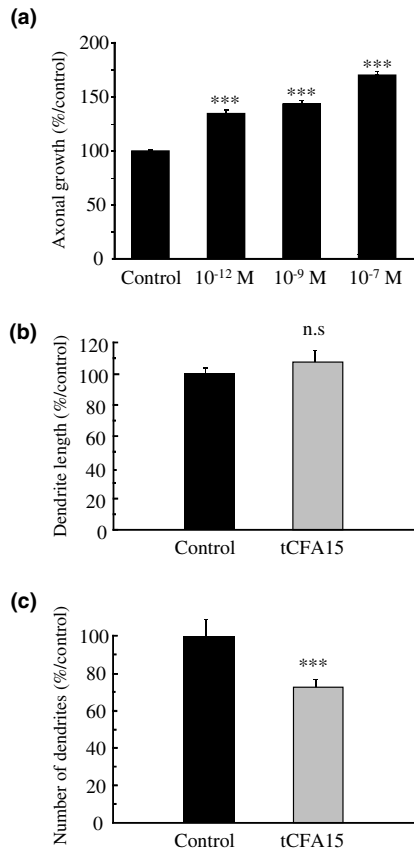


**Fig. 1** Model of cortical neurones. Immunostaining of phosphorylated neurofilament allowed the identification of axon (green staining) versus dendrite (no staining). Neurones were grown on a neutral poly-L-lysine substrate and observed using (a) interferential contrast objective or (b) fluorescence before (c) overlay of both images. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ . Representative growth of cortical axon outgrowth (d) in the control condition or (e) in the presence of 0.1  $\mu\text{M}$  tCFA15. Axons are visualized after an immunostaining of phospho-neurofilament. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ .

possible to identify dendrites as the non-neurofilament positive processes (Figs 1a–c). Thus, we found that the neurotrophic effect of tCFA15 was axon specific because the mean dendritic length was similar to control (Fig. 2b). In fact, we observed a significant reduction of the number of dendritic processes extending from the cell body ( $-40\%$ ,  $p < 0.05$ , Student's *t*-test, Fig. 2c). Hence, tCFA15 acts on the polarity of cortical neurones by favouring axon extension instead of dendrite formation (Figs 1 and 2).

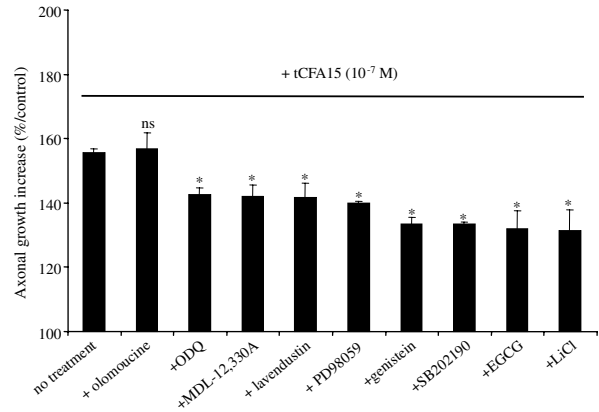
### tCFA15 is a general activator of growth-promoting pathways

To elucidate the molecular mechanism of tCFA15 we repeated the experiments in the presence of various selective inhibitors of growth-associated intracellular pathways. As described in Fig. 3, the growth-promoting effect of tCFA15 was significantly reduced by the general inhibitors of tyrosine kinases (lavendustine,  $-25\%$  and genistein,  $-40\%$ ), ERK1/2 (Alessi *et al.* 1995) and the p38 MAPK (Engelman *et al.* 1998) inhibitors (2'-amino-3'-methoxyflavone,  $-28\%$  and 4-[4-fluorophenyl]-2-[4-hydroxyphenyl]-5-[4-pyridyl]-1H-imidazole,  $-40\%$ ) and the inhibitors of adenylate and guanylate cyclases [*cis*-*N*-(2-phenylcyclopentyl)-azacyclotridec-1-en-2-amine hydrochloride,  $-25\%$  and



**Fig. 2** Promoting effect of tCFA15 on axonal growth. (a) Addition of tCFA15 produced a dose-dependent increase of axonal length. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0.001$  versus control. (b and c) Lack of growth-promoting effect of tCFA15 ( $10^{-7}$  M) on dendrites. (b) The determination of mean individual dendrite length revealed no effect of tCFA15 whereas (c) tCFA15 ( $10^{-7}$  M) induced a significant reduction of the number of dendrites per neurones.

1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, -23%]. The strongest inhibition was observed in the presence of the oxidoreductase blocker EGCG (-42%) and the serine/threonine kinase blocker LiCl (-43%). No significant reduction of the growth-promoting effect of tCFA15 was detected in the presence of the cyclin-dependent kinase inhibitor olomoucine. Thus, tCFA15 requires multiple intracellular pathways to trigger its growth-promoting effect. To address the functional consequence of such a general activation of growth-promoting pathways, we performed rhodamine phalloidin staining to analyse the modulation of the actin cytoskeleton as an index of axon extension. In the control conditions, we found that axons and their growth cones exhibited moderate actin-rich surface protrusions (filopodia) in 40% of the neurones (Figs 4a and c). On the other hand, the addition of tCFA15 significantly increased, in a dose-dependent manner, the formation of filopodia which were more numerous and present in more than 70–85% of the neurones (Figs 4b and c).



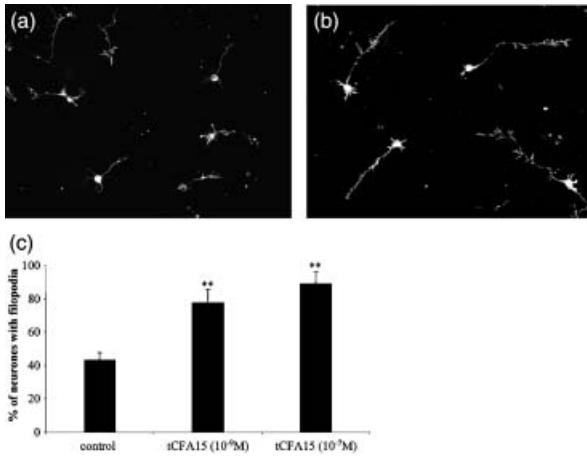
**Fig. 3** Determination of the pharmacological properties of tCFA15. Cortical neurones were grown in the presence of tCFA15 ( $10^{-7}$  M) and various pharmacological inhibitors including two general inhibitors of tyrosine kinase (genistein,  $10 \mu\text{M}$  AND lavendustin,  $1 \mu\text{M}$ ), one cyclin-dependent protein kinase inhibitor (olomoucine,  $1 \mu\text{M}$ ), a serine/threonine kinase inhibitor (LiCl,  $1 \text{mM}$ ), two MAPK inhibitors [4-[4-fluorophenyl]-2-[4-hydroxyphenyl]-5-[4-pyridyl]-1H-imidazole (SB202190),  $10 \mu\text{M}$  and 2'-amino-3'-methoxyflavone (PD98059),  $10 \mu\text{M}$ ], inhibitors of adenylate cyclase [*cis*-N-(2-phenylcyclopentyl)-azacyclotridec-1-en-2-amine hydrochloride (MDL-12,330),  $1 \mu\text{M}$ ] or guanylate cyclase [1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ),  $1 \mu\text{M}$ ] and an oxidoreductase inhibitor [epigallocatechin gallate (EGCG),  $1 \mu\text{M}$ ]. Data are presented as a percentage of growth increase  $\pm$  SEM compared with the control situation (tCFA15 without inhibitors). \* $p < 0.01$  versus no treatment. ns, not significant, Student's *t*-test.

### tCFA15 prevents the inhibitory effect of Semaphorin 3A

One of the principal obstacles to nerve regeneration is the accumulation of numerous inhibitory molecules within the lesion site. In an attempt to study the effect of tCFA15 in the presence of inhibitory factors up-regulated after an injury in the CNS, cortical neurones were incubated with Sema3A and tCFA15. As described in Fig. 5(a), addition of  $100 \text{ ng/mL}$  Sema3A induced a 40% reduction of axonal growth relative to control. Strikingly, addition of  $10^{-7}$  M tCFA15 in the presence of Sema3A was able to restore an axonal growth comparable to that of the control. Thus, the neurotrophic activity of tCFA15 is able to counteract the inhibitory property of Sema3A (Fig. 5a).

### tCFA15 prevents inhibitory effect of myelin extracts

In order to further investigate the capacity of tCFA15 to restore a functional growth in the presence of inhibitory factors, we decided to repeat the experiments with other inhibitory factors, such as myelin proteins. To this end, a myelin extract was used as a substrate for elongating cortical axons. Under these conditions, we observed a dose-dependent decrease of axon length as a function of myelin extract concentrations (Fig. 5b). The maximal concentration of  $10 \mu\text{g/mL}$  myelin extract used in these experiments induced a 35% decrease of axon extension. Similar to what we found

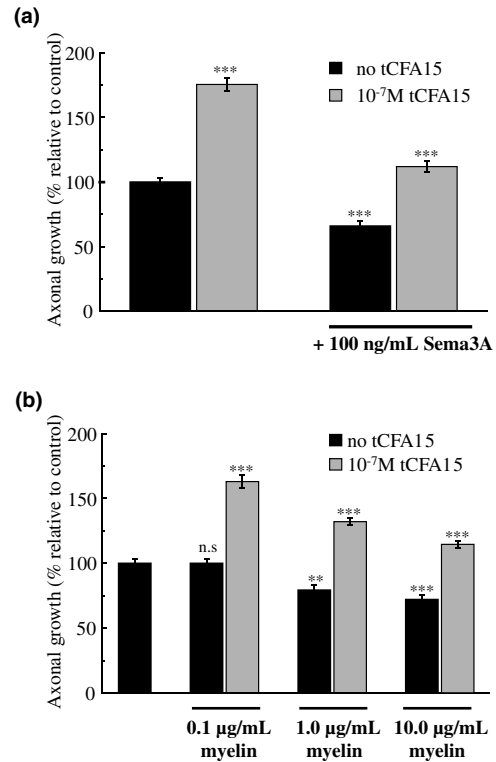


**Fig. 4** tCFA15 induces filopodia formation. To visualize the actin cytoskeleton modulations in response to tCFA15, we performed a rhodamine phalloidin staining. Cortical neurones exhibit few filopodia (a) in control conditions whereas (b) addition of tCFA15 ( $10^{-7}$  M) induced numerous filopodia. (c) Quantitative analysis of the number of neurones with filopodia. \*\* $p < 0.01$   $\chi^2$  analysis.

in the presence of Sema3A, addition of  $10^{-7}$  M tCFA15 counteracted the inhibitory effect of myelin proteins. In all cases, axon growth was significantly higher compared with control conditions without tCFA15 (+32.2% on 1  $\mu$ g/mL myelin extract, +14.72% on 10  $\mu$ g/mL myelin extract,  $p < 0.05$  Student's *t*-test). To further demonstrate the growth-promoting effect of tCFA15 in the presence of myelin, we determined the number of neurones exhibiting axons. This was necessary because the measurement of axonal length underestimated the growth inhibitory effect of myelin extracts as many neurones exhibited no axon outgrowth when exposed to myelin proteins. The results presented in Fig. 6 show that only 43% ( $\pm 4.2$ ;  $n = 783$ ) of the neurones were growing on myelin extracts. On the other hand, addition of tCFA15 ( $10^{-7}$  M) restored axon outgrowth in 69% ( $\pm 4.16$ ;  $n = 566$ ) of the neurones, similar to the control condition (67%  $\pm 2.55$ ;  $n = 330$ ). Thus, tCFA15 appears to be a strong neurotrophic compound capable of exerting its function despite multiple inhibitory factors.

#### tCFA15 does not antagonize the transduction pathways of inhibitory molecules

The capacity of tCFA15 to promote axon outgrowth in the presence of inhibitory factors could be due to its capacity to antagonize the growth inhibitory pathways or to maintain activation of growth-promoting pathways. To address this possibility, we monitored the phosphorylation level of phospho-Cdk5, which has been shown to be increased during the inhibitory signalling triggered by Sema3A (Sasaki *et al.* 2002). The western blot analysis revealed that the phosphorylation level of Cdk5 was significantly higher when cortical neurones were grown in the presence of Sema3A or



**Fig. 5** Growth-promoting effect of tCFA15 on axonal growth in the presence of various inhibitory factors. tCFA15 is able to promote axon outgrowth despite the presence of (a) Semaphorin 3A (Sema3A) or (b) myelin proteins. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus control. n.s., not significant.

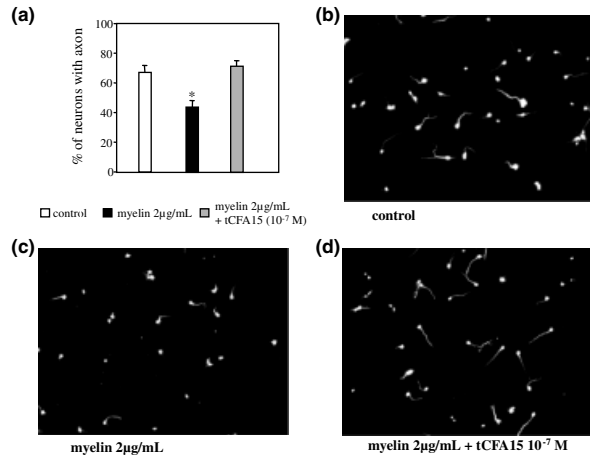
Sema3A and tCFA15 compared with the control situation (+186.5  $\pm$  34.8 and +159.7  $\pm$  10.1%, respectively,  $p < 0.01$ , Student's *t*-test). No significant increase of phospho-Cdk5 was monitored in the presence of tCFA15 alone. Thus, tCFA15 was not able to antagonize the transduction pathway triggered by Sema3A.

#### Discussion

The success of CNS regeneration is largely dependent on the growth capacity of axons. Both the lack of growth-promoting factors and the expression of growth inhibitory factors repress nerve regeneration. Innovative therapeutic strategies must, therefore, take into account this crucial problem in order to be effective. We designed a new neurotrophic compound composed of a  $\omega$ -alkanol chain combined with a retinol-like cycle (tCFA15). Previous studies have demonstrated the trophic activity of tCFA15 for CNS neurones (Gonzalez de Aguilar *et al.* 2001). In the present study we show that this growth-promoting effect is specific for axons and is able to counteract some of the major inhibitory molecules shown to be over-expressed in a lesion site.

Interestingly, tCFA15 had no growth-promoting effect on dendrites, which were as long as in the control conditions.

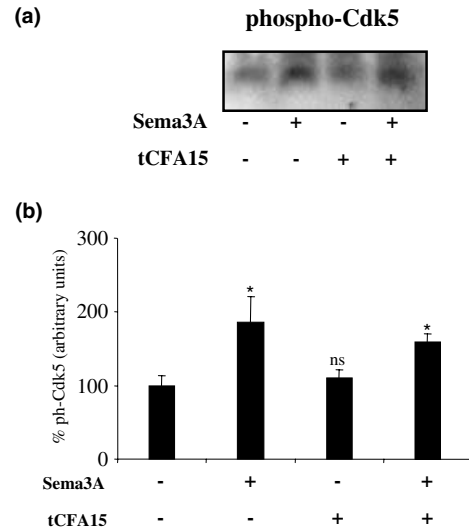




**Fig. 6** (a) Quantification of the number of neurones exhibiting axons under various experimental conditions. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , Student's *t*-test. Representative micrographs showing cortical neurones in (b) control condition, (c) 2  $\mu$ g/mL myelin-containing substrates and (d) myelin + tCFA15 ( $10^{-7}$  M).

Rather, the analysis of the mean number of dendrites revealed a significant reduction of the number of dendritic processes suggesting, therefore, that tCFA15 might interfere with cortical neurone polarity by favouring axon outgrowth. The acquisition of neuronal polarity is an important stage of cell differentiation determining the function of the different neuritic processes (Andersen and Bi 2000). Our results suggest that tCFA15 might exert its function by modulating the actin dynamic according to subcellular specificity. In terms of nerve regeneration, this property might be important because the observed switch from extension of axons to extension of dendrites during normal development might contribute to regeneration failure (Condic 2002).

The current view is that many of the factors expressed in the glial scar, being formed in nerve lesions, are key regulators of CNS development. Moreover, adult and foetal neurones respond to Semaphorins in a similar way (Tanelian *et al.* 1997). Several studies now indicate that the variations of Semaphorin 3A expression in lesion sites might be correlated to the lack of nerve regeneration (De Winter *et al.* 2002). Considering that Semaphorin 3A is mainly a growth inhibitor for distinct neuronal populations during brain development, the presence of Semaphorin 3A in fibroblast-like meningeal cells in the neural scar might impede axons from going across the lesion site (Nicolou *et al.* 2003). Thus, the inactivation of the growth inhibitory property of Semaphorin 3A might represent an interesting strategy to promote nerve regeneration in the CNS. In our model, cortical neurones are very sensitive to Semaphorin 3A, which induced a strong reduction of axon extension at a low concentration (100 ng/mL) similar to our previous results which demonstrated the chemorepulsive role of Semaphorin 3A for cortical neurones (Bagnard *et al.* 1998, 2000). The presence of tCFA15 ( $10^{-7}$  M) was sufficient to counteract the Semaphorin 3A-



**Fig. 7** Growth-promoting effect of tCFA15 in the presence of Semaphorin 3A (Sema3A) is not due to an antagonism of Semaphorin 3A signalling. (a) Western blot analysis of the level of phospho-Cdk5 as a reflection of the Semaphorin 3A signalling cascade. (b) Quantitative analysis of western blots. Results were obtained for three independent experiments. \* $p < 0.01$ . ns, not significant, Student's *t*-test.

dependent growth inhibition. Other inhibitory factors, such as chondroitin sulphate proteoglycans, are also largely responsible for the lack of nerve regeneration. Hence, the combination of synthetic neurotrophic compounds and chondroitinase, that has been shown to promote spinal cord regeneration by degrading chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) (Bradbury *et al.* 2002; Zuo *et al.* 2002), might, for example, represent an interesting strategy to cure nerve lesions.

This is further supported by our results showing that tCFA15 is able to stimulate axon outgrowth even in the presence of multiple inhibitory factors, as demonstrated by experimental growth on myelin extract-containing substrates. Myelin-associated neurite growth inhibitors, including Nogo and MAG, are extremely important in the inhibition of nerve regeneration (Fournier and Strittmatter 2001). Many studies are investigating function blocking strategies to improve axonal growth and functional recovery following nerve lesion by providing antagonists to the receptors of inhibitory proteins or by modifying the signalling pathways triggered by these factors (Schwab 2002). Our results provide evidence for a potential application of tCFA15 as a general growth-promoting compound overcoming the signal transduction of such diverse inhibitory factors. The molecular mechanism of tCFA15 remains to be fully elucidated. Nevertheless, the block of various intracellular pathways involved in axon outgrowth and guidance, such as tyrosine kinases (Desai *et al.* 1997), MAPK (Vaudry *et al.* 2002; Campbell and Holt 2003), cyclic nucleotides (Song and Poo 1999; Nishiyama *et al.* 2003) or serine/threonine kinase (Jones *et al.* 2003; Eickholt 2002), significantly reduced the tCFA15 growth-

promoting effect. Interestingly, the addition of EGCG, an inhibitor of flavoprotein monooxygenases (Terman *et al.* 2002), also reduced the growth-promoting effect, suggesting that tCFA15 possesses an antioxidant activity favouring axon extension. One general problem with the use of pharmacological inhibitors is their lack of real specificity (Davies *et al.* 2000). For instance, EGCG also inhibits protein kinases such as PRAK, DYRK and ROCK-II (Bain *et al.* 2003). Moreover, the addition of most of the agents used in the present study caused a marked reduction of axon outgrowth in the control condition without tCFA15. Therefore, it is not possible to establish a hierarchy of the signalling pathways recruited by tCFA15. Rather, the present results demonstrate that tCFA15 exerts its growth-promoting effect by activating various parallel pathways which compensate each other as it was not possible to completely suppress tCFA15-dependent growth promotion. Considering that these pathways participate directly or indirectly in the modulation of the actin dynamic, these results suggest that tCFA15 acts as a general activator of multiple intracellular pathways leading to actin remodelling. Indeed, our data provide evidence for a modulation of the actin cytoskeleton by tCFA15. Rhodamine phalloidin staining revealed a dose-dependent increase of filopodia formation in neurones treated with tCFA15. This strongly suggested a specific activation of Cdc42 which is known to be a key regulator of filopodia formation (Hall 1998). This is particularly interesting in the perspective of nerve regeneration because recent studies have demonstrated that the activation of RhoA, inhibiting neurite outgrowth, might represent the point of convergence of the signalling pathways triggered by the inhibitory factors MAG and Nogo (Fournier *et al.* 2003; McGee and Strittmatter 2003). Considering the fact that Cdc42 and RhoA have opposing effects on the remodelling of the actin cytoskeleton, a putative promotion of Cdc42 activation by tCFA15 might represent an interesting feature favouring nerve regeneration. To investigate how tCFA15 exerts its growth-promoting effects in the presence of inhibitory factors, such as those encountered in a CNS lesion site, we monitored the phosphorylation levels of Cdk5, a cyclin-dependent kinase which has been shown to mediate Sema3A-induced growth cone collapse (Sasaki *et al.* 2002). We found that tCFA15 was not able to reduce the phosphorylation level of Cdk-5 reached in the presence of Sema3A. Hence, the growth-promoting effect observed in the presence of Sema3A seems to be essentially due to the general activation of numerous growth-promoting pathways but not to the block of the Sema3A inhibitory signalling. Moreover, it has been shown that prior exposure to neurotrophins blocks the inhibition of axonal growth of dorsal root ganglions (DRG) neurones by MAG and myelin substrates (Cai *et al.* 1999). This effect of neurotrophins was mediated by an increase of intracellular cAMP concentration (Cai *et al.* 2001). Such results are in favour of the use of neurotrophins as potential therapeutic targets to promote

nerve regeneration. In our model, prior exposure to tCFA15 was not necessary to observe the growth-promoting effect in the presence of the inhibitory factors tested. Thus, tCFA15 could be applied at any stage of the lesion and may represent an ideal therapeutic agent challenging the general problem of low bio-availability and poor stability of neurotrophins and other proteic substances. Finally, recent papers presenting the regeneration phenotypes of three different Nogo knockout mice pointed out the necessity of developing drugs with general effects rather than being specific for a single inhibitory molecule (Kim *et al.* 2003; Simonen *et al.* 2003; Zheng *et al.* 2003). In fact, many questions remain to be answered about the molecular mechanism of inhibitory molecules like Nogo before using specific blockers of such factors in patients (Woolf 2003). In contrast, tCFA15 is designed in such a way as to circumvent bio-availability problems, activated numerous growth-promoting pathways and is able to counteract multiple growth inhibitory factors. So far, our *in vitro* studies, together with results showing a beneficial effect of tCFA15 on peripheral neuropathy *in vivo* (Watanabe and Miyagawa 2002), provide consistent data that tCFA15 might represent an outstanding compound with strong clinical potential when the aspects of drug administration, compound stability, passage through the blood-brain barrier and lack of toxicity are clarified. Future studies will investigate the function of tCFA15 *in vivo* in a model of a nerve lesion to further validate the present *in vitro* data.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from the FRM (no. INE20011109006) and BQR-ULP (no. BE/CH/2001-225 V) to DB and from Meiji Dairies Corporation (Japan) to MH and BL. We thank A.W. Püschel for providing the Sema3A-expressing cell line and J. Bolz for helpful comments on the manuscript.

### References

- Adams R. H., Lohrum M., Klostermann A., Betz H. and Püschel A. W. (1997) The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J.* **16**, 6077–6086.
- Alessi D. R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D. T. and Saltiel A. R. (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **270**, 27489–27494.
- Andersen S. S. and Bi G. Q. (2000) Axon formation: a molecular model for the generation of neuronal polarity. *Bioessays* **22**, 172–179.
- Bagnard D., Lohrum M., Uziel D., Püschel A. W. and Bolz J. (1998) Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* **125**, 5043–5053.
- Bagnard D., Thomasset N., Lohrum M., Püschel A. W. and Bolz J. (2000) Spatial distributions of guidance molecules regulate chemorepulsion and chemoattraction of growth cones. *J. Neurosci.* **20**, 1030–1035.

- Bagnard D., Chounlamountri N., Puschel A. W. and Bolz J. (2001a) Axonal surface molecules act in combination with semaphorin 3a during the establishment of corticothalamic projections. *Cereb. Cortex* **11**, 278–285.
- Bagnard D., Vaillant C., Khuth S. T., Dufay N., Lohrum M., Puschel A. W., Belin M. F., Bolz J. and Thomasset N. (2001b) Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J. Neurosci.* **21**, 3332–3341.
- Bain J., McLauchlan H., Elliott M. and Cohen P. (2003) The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* **371**, 199–204.
- Bradbury E. J., Moon L. D., Popat R. J., King V. R., Bennett G. S., Patel P. N., Fawcett J. W. and McMahon S. B. (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* **416**, 636–640.
- Cai D., Shen Y., De Bellard M., Tang S. and Filbin M. T. (1999) Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron* **22**, 89–101.
- Cai D., Qiu J., Cao Z., McAtee M., Bregman B. S. and Filbin M. T. (2001) Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J. Neurosci.* **21**, 4731–4739.
- Campbell D. S. and Holt C. E. (2003) Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. *Neuron* **37**, 939–952.
- Condic M. L. (2002) Neural development: axon regeneration derailed by dendrites. *Curr. Biol.* **12**, R455–R457.
- Davies S. P., Reddy H., Caivano M. and Cohen P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* **351**, 95–105.
- Desai C. J., Sun Q. and Zinn K. (1997) Tyrosine phosphorylation and axon guidance: of mice and flies. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 70–74.
- De Winter F., Holtmaat A. J. and Verhaagen J. (2002) Neuropilin and class 3 semaphorins in nervous system regeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* **515**, 115–139.
- Eickholt B. J., Walsh F. S. and Doherty P. (2002) An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signalling. *J. Cell Biol.* **157**, 211–217.
- Engelman J. A., Lisanti M. P. and Scherer P. E. (1998) Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 32c111–32120.
- Fouad K., Dietz V. and Schwab M. E. (2001) Improving axonal growth and functional recovery after experimental spinal cord injury by neutralizing myelin associated inhibitors. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **36**, 204–212.
- Fournier A. E. and Strittmatter S. M. (2001) Repulsive factors and axon regeneration in the CNS. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 89–94.
- Fournier A. E., Takizawa B. T. and Strittmatter S. M. (2003) Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J. Neurosci.* **23**, 1416–1423.
- Gimenez y Ribotta M., Gaviria M., Menet V. and Privat A. (2002) Strategies for regeneration and repair in spinal cord traumatic injury. *Prog. Brain Res.* **137**, 191–212.
- Girlanda-Junges C., Lutz-Bucher B., Gonzalez de Aguilar J. L., Loeffler J. P. and Luu B. (2000) 3-(15-Hydroxypentadecyl)-2,4,4-trimethyl-2-cyclohexen-1-one and its effect on neuropeptide secretion. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 2537–2539.
- Gonzalez de Aguilar J. L., Girlanda-Junges C., Coowar D., Dupontail G., Loeffler J. P. and Luu B. (2001) Neurotrophic activity of 2,4,4-trimethyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexen-1-one in cultured central nervous system neurons. *Brain Res.* **920**, 65–73.
- Gurgo R. D., Bedi K. S. and Nurcombe V. (2002) Current concepts in central nervous system regeneration. *J. Clin. Neurosci.* **9**, 613–617.
- Hall A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509–514.
- Jones D. M., Tucker B. A., Rahimtula M. and Mearow K. M. (2003) The synergistic effects of NGF and IGF-1 on neurite growth in adult sensory neurons: convergence on the PI 3-kinase signaling pathway. *J. Neurochem.* **86**, 1116–1128.
- Kim J. E., Li S., GrandPre T., Qiu D. and Strittmatter S. M. (2003) Axon regeneration in young adult mice lacking nogo-a/b. *Neuron* **38**, 187–199.
- Liu Y., Kim D., Himes B. T., Chow S. Y., Schallert T., Murray M., Tessler A. and Fischer I. (1999) Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. *J. Neurosci.* **19**, 4370–4387.
- McGee A. W. and Strittmatter S. M. (2003) The Nogo-66 receptor: focusing myelin inhibition of axon regeneration. *Trends Neurosci.* **26**, 193–198.
- Niclou S. P., Franssen E. H., Ehlert E. M., Taniguchi M. and Verhaagen J. (2003) Meningeal cell-derived semaphorin 3A inhibits neurite outgrowth. *Mol. Cell Neurosci.* **24**, 902–912.
- Nishiyama M., Hoshino A., Tsai L., Henley J. R., Goshima Y., Tessier-Lavigne M., Poo M. M. and Hong K. (2003) Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca<sup>2+</sup> channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* **424**, 990–995.
- Norton W. T. and Poduslo S. E. (1973) Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J. Neurochem.* **21**, 749–757.
- Pasterkamp R. J. and Verhaagen J. (2001) Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **35**, 36–54.
- Ramer M. S., Priestley J. V. and McMahon S. B. (2000) Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. *Nature* **403**, 312–316.
- Sasaki Y., Cheng C., Uchida Y. *et al.* (2002) Fyn and Cdk5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex. *Neuron* **35**, 907–920.
- Schnell L., Schneider R., Kolbeck R., Barde Y. A. and Schwab M. E. (1994) Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* **367**, 170–173.
- Schwab M. E. (2002) Repairing the injured spinal cord. *Science* **295**, 1029–1031.
- Simonen M., Pedersen V., Weinmann O., Schnell L., Buss A., Ledermann B., Christ F., Sansig G., van der Putten H. and Schwab M. E. (2003) Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor nogo-a improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron* **38**, 201–211.
- Song H. J. and Poo M. M. (1999) Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 355–363.
- Tanelian D. L., Barry M. A., Johnston S. A., Le T. and Smith G. M. (1997) Semaphorin III can repulse and inhibit adult sensory afferents in vivo. *Nat. Med.* **3**, 1398–1401.
- Terman J. R., Mao T., Pasterkamp R. J., Yu H. H. and Kolodkin A. L. (2002) MICALS, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell* **109**, 887–900.
- Tuszynski M. H., Murai K., Blesch A., Grill R. and Miller I. (1997) Functional characterization of NGF-secreting cell grafts to the acutely injured spinal cord. *Cell Transplant* **6**, 361–368.
- Vaudry D., Stork P. J., Lazarovici P. and Eiden L. E. (2002) Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* **296**, 1648–1649.
- Watanabe T. and Miyagawa I. (2002) Effects of long-chain fatty alcohol on peripheral nerve conduction and bladder function in diabetic rats. *Life Sci.* **70**, 2215–2224.

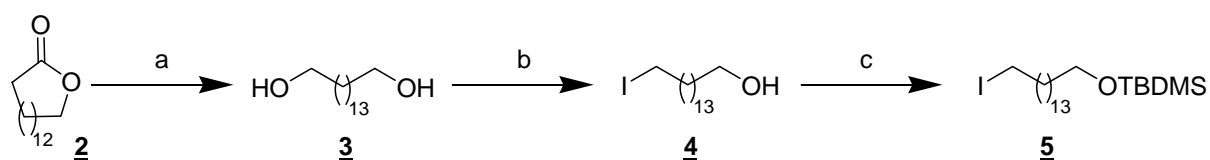
- Woolf C. J. (2003) No nogo. Now where to go? *Neuron* **38**, 153–156.
- Xie Y. and Longo F. M. (2000) Neurotrophin small-molecule mimetics. *Prog. Brain Res.* **128**, 333–347.
- Zheng B., Ho C., Li S., Keirstead H., Steward O. and Tessier-Lavigne M. (2003) Lack of enhanced spinal regeneration in nogo-deficient mice. *Neuron* **38**, 213–224.
- Zuo J., Neubauer D., Graham J., Krekoski C. A., Ferguson T. A. and Muir D. (2002) Regeneration of axons after nerve transection repair is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *Exp. Neurol.* **176**, 221–228.

### III. SYNTHÈSE CHIMIQUE DU tCFA15

La première synthèse du tCFA15 a été décrite par Girlanda-Jungès et coll.<sup>1</sup> en 2000. En 2004, une amélioration de la synthèse de ce même composé a été mise en avant par Luu et coll.<sup>2</sup>. Cette synthèse est décrite ci-dessous.

#### A. Synthèse de la chaîne latérale $\omega$ -alcanol

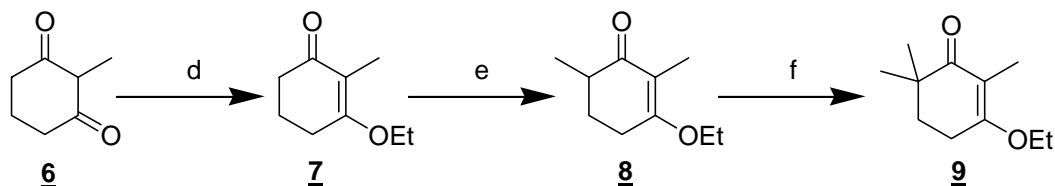
La chaîne  $\omega$ -alcanol utilisée pour synthétiser le tCFA15 est issue d'une réduction du pentadécanolide **2** par l'hydrure mixte de lithium et d'aluminium, suivi d'une monoiodation du pentadécan-1, 15-diol **3** en milieu hétérogène HI et cyclohexane. La fonction hydroxyle du 15-iodopentadécan-1-ol **4** est ensuite protégée par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle pour donner le composé **5**.



a)  $\text{LiAlH}_4$ , THF,  $0^\circ\text{C}$  à t.a. **75%** b) HI 57%, Cyclohexane, Reflux, 6h, **60%** c) i) TBDMS-Cl, Imid.,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 3h, **98%**.

#### B. Synthèse du cycle cyclohexénique triméthylé

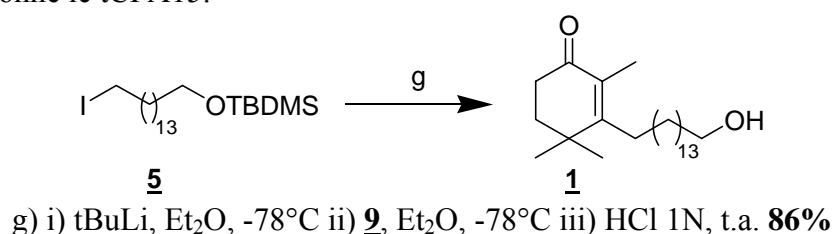
Le cycle cyclohexénique constituant le tCFA15 est issu de la 2-méthylcyclohexan-1,3-dione **6** qui, suite à une protection de l'un des deux groupements cétones sous forme d'éther d'énol pour donner le 3-éthoxy-2-méthylcyclohexèn-2-énone **7**. Ce dernier subit ensuite deux méthylations consécutives en position 6 pour donner le 3-éthoxy-2,6-diméthylcyclohexèn-2-énone **8** puis le 3-éthoxy-2,6,6-triméthylcyclohexèn-2-énone **9**. La double méthylation *in situ*, quant à elle, ne donne pas de rendements convenables.



d) *p*TsOH, EtOH, Toluène, Reflux, **89%** e) i) LDA ii) MeI, THF,  $-78^\circ\text{C}$  à t.a., **86%** f) i) LDA ii) MeI, THF,  $-78^\circ\text{C}$  à t.a., **92%**.

### C. Couplage et obtention du tCFA15

Les composés **5** et **9** ainsi obtenus sont couplés selon la réaction suivante. Un échange halogène-métal est effectué sur le composé **5** avec du tert-butyllithium. Ce nucléophile s'additionne sur la cétone du composé **9** qui, suite à une déprotection de l'éther d'énol en milieu acide donne le tCFA15.



Cette voie de synthèse permet d'obtenir le produit final avec un rendement global de 38%.

## IV. PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DU tCFA15

L'activité antioxydante du tCFA15 a été étudiée à l'aide de deux tests différents, le test au DPPH et le test à l'ABTS.

### A. Test au DPPH<sup>3</sup>

#### 1. Principe du test

Le DPPH, ou 2,2-di(4-tert-octylphényl)-1-picrylhydrazyle, est un radical stabilisé qui absorbe à 550 nm lorsqu'il est solubilisé dans de l'éthanol pur (figure 40). Lorsqu'il est mis en présence d'un composé antioxydant, il est réduit et de ce fait n'absorbe plus à 550 nm. Cette diminution de l'absorbance à 550 nm est directement proportionnelle à la quantité de radical DPPH non réduit restant dans le milieu et donc traduit une activité de piègeur de radicaux pour le composé testé.

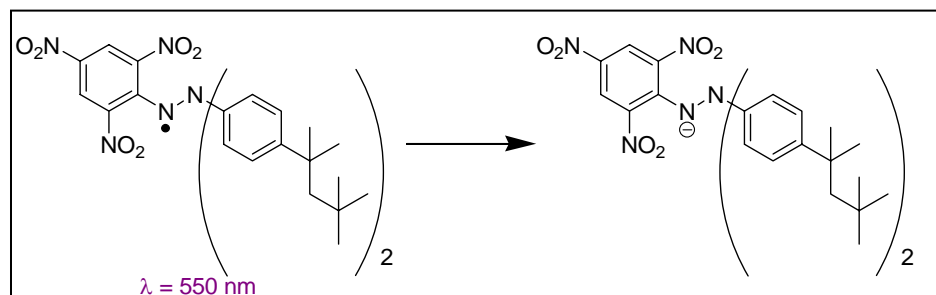


Fig. 40 :  
Neutralisation  
du radical  
DPPH

## 2. Résultat concernant le tCFA15

Le test au DPPH a été effectué avec deux antioxydants connus : le Trolox® (un dérivé soluble de la vitamine E) et l'acide ascorbique (vitamine C), ainsi que sur le tCFA15. Les résultats, exprimés en concentration nécessaire à réduire 50% du radical DPPH ( $IC_{50}$ ), sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Produit testé	$IC_{50}$ (mM)
Vitamine C	0,048
Trolox®	0,275
tCFA15	> 10

La valeur de l' $IC_{50}$  du tCFA15 indique que ce dernier n'est pas capable de réduire le radical DPPH.

### B. Test à l'ABTS<sup>4</sup>

#### 1. Principe du test

L'ABTS, ou acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique) (fig. 41), est un composé qui en présence de radicaux hydroxyles peut donner un radical cation  $ATBS^{\cdot+}$  qui absorbe à 405 nm (Equation 1).

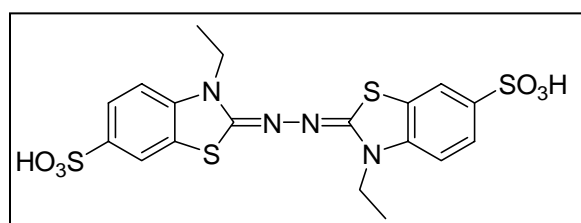


Fig. 41 : Formule semi-développée de l'ABTS

Durant l'expérience, les radicaux hydroxyles sont générés par la réaction de Fenton (Equation 2).



Ces radicaux hydroxyles ainsi générés peuvent générer le radical cation  $ATBS^{\cdot+}$ . Si dans le milieu on rajoute un composé qui est capable de réduire les radicaux hydroxyles en ions hydroxyles, il se met en place une compétition entre le composé antioxydant et l'ABTS pour

les radicaux hydroxyles. Cette compétition se traduit par une diminution de l'absorbance à 405 nm qui est directement proportionnelle à la capacité antioxydante du composé testé.

## 2. Résultat concernant le tCFA15

Le test à l'ABTS a été effectué avec la même référence que pour le test au DPPH, à savoir le Trolox®, ainsi que sur le tCFA15. Les résultats, exprimés en IC<sub>50</sub>, sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Produit testé	IC <sub>50</sub> (mM)
Trolox®	0,6
tCFA15	> 10

La valeur de l'IC<sub>50</sub> du tCFA15 indique que ce dernier n'est pas capable de réduire les radicaux hydroxyles.

### C. Incorporation du tCFA15 dans des vésicules multilamellaires de DPPC

D'après les résultats présentés ci-dessus, le tCFA15 n'a pas d'activité antioxydante apparente. Cependant, d'après des études effectuées sur les quinones, Tomasetti et coll.<sup>5</sup> avancent que la forme quinone (oxydée) pourrait avoir un léger effet antioxydant en tant que stabilisateur de la bicouche phospholipidique. En effet, comme le cholestérol, la forme quinonique aurait un rôle de stabilisateur membranaire qui empêcherait l'attaque de la membrane par les radicaux libres. Des travaux non publiés, effectués par le Dr. Guy Duportail, montrent que le tCFA15 a un comportement voisin de celui du cholestérol, à savoir qu'il déstabilise une bicouche lipidique à l'état gel, avec diminution de la température de transition de phase, et stabilise l'état cristal liquide en diminuant (légèrement) sa fluidité.

#### 1. Principe du test<sup>6</sup>

Des vésicules multilamellaires de **DiPalmitoylPhosphatidylCholine** (DPPC) sont obtenues soit pures, soit en y incorporant du tCFA15 à 5% et 10%. Ces vésicules sont en outre marquées par ajout d'une sonde fluorescente lipophile, le 1,6-diphényl-1,3,5-héxatriène (DPH). Cette sonde est communément utilisée pour mesurer la "microviscosité" membranaire (ou inversement sa fluidité) par mesure de son anisotropie de fluorescence.

L'anisotropie de fluorescence est une technique qui permet de mesurer la diffusion de rotation d'une molécule fluorescente, pendant un temps donné  $\tau$  correspondant au temps de vie de la



molécule fluorescente, ceci dans un milieu donné. Tout paramètre, comme par exemple la fluidité du milieu, qui influe sur le mouvement de rotation de la sonde peut donc être indirectement mesuré par cette technique.

L'anisotropie de fluorescence peut se définir à partir de deux vecteurs (moments dipolaires) caractéristiques de la molécule fluorescente considérée :

- le vecteur moment dipolaire d'absorption :  $\mu_A$
- le vecteur moment dipolaire d'émission :  $\mu_E$

L'anisotropie de fluorescence, notée « r », peut se définir à partir de l'angle  $\alpha$  formé entre les deux vecteurs  $\mu_A$  (au temps  $t = 0$  auquel se produit la transition d'absorption) et  $\mu_E$  (au moment où sont émis les photons de fluorescence,  $t = \tau$ ) selon la relation

$$r = (3 \cos^2\alpha - 1)/2$$

Cet angle  $\alpha$  intègre l'angle  $\alpha_0$  intrinsèque entre les deux moments de transition pour la molécule immobile, et un angle  $\alpha(t)$  résultant de la diffusion brownienne de rotation. Dans un milieu rigide, dans lequel les molécules ne peuvent tourner, seul intervient l'angle  $\alpha_0$ . L'anisotropie r peut donc atteindre une valeur maximale (anisotropie fondamentale  $r_0$ ) de 0,4 dans le cas particulier où les deux moments  $\mu_A$  et  $\mu_E$  sont colinéaires. Dans le cas du DPH, l'angle  $\alpha_0$  n'est pas totalement nul et la valeur de  $r_0$  est de 0.362. A l'inverse, dans un milieu très fluide, le mouvement brownien de rotation de grande ampleur conduira à une valeur de r nulle. En conséquence, pour le DPH, l'échelle d'anisotropie allant de 0 (milieu très fluide) à 0.362 (milieu rigide, de viscosité "infinie") sera également une échelle de fluidité. Ainsi, une vésicule phospholipique à l'état gel donnera une anisotropie supérieure à 0.3, alors qu'à l'état cristal liquide elle ne sera plus que de 0.1, ces deux valeurs variant avec la température qui influe elle-même sur le mouvement brownien, et donc sur la fluidité.

## 2. Résultats sur le tCFA15

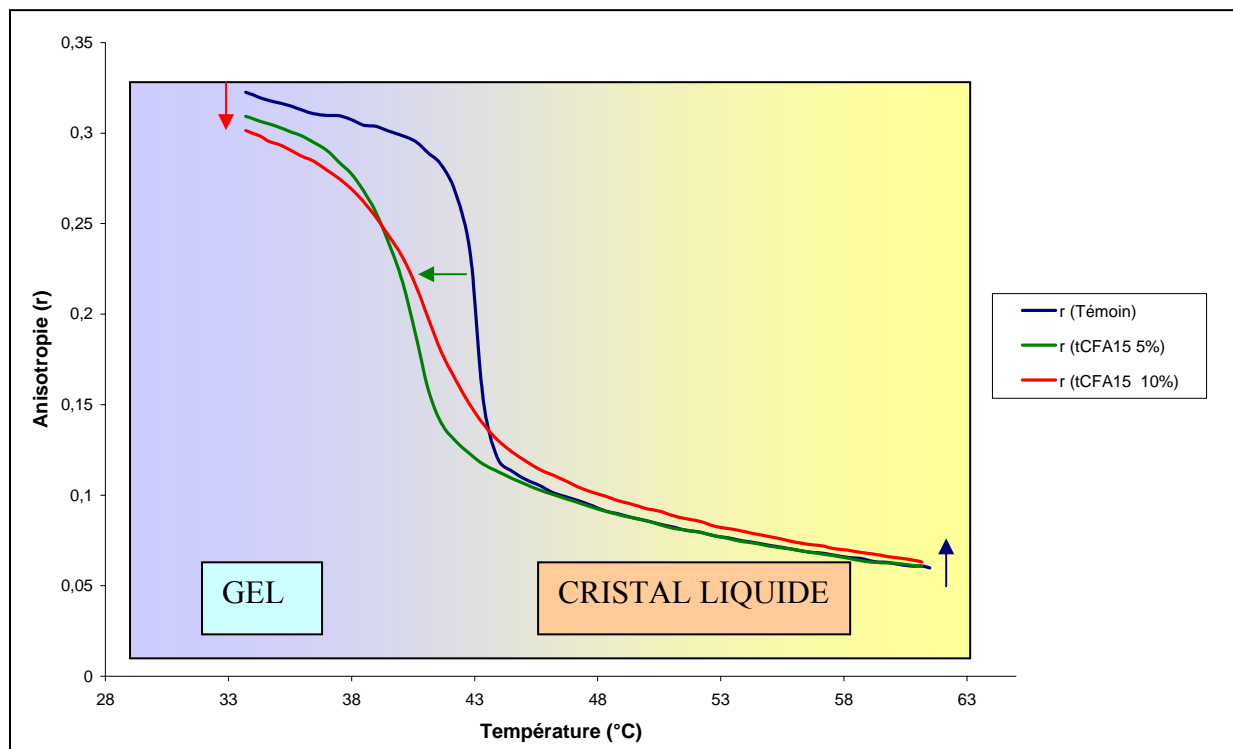
La mesure de l'anisotropie de fluorescence du DPH marquant des vésicules de DPPC ayant incorporé du tCFA15 traduit l'effet de cette incorporation sur la stabilité et la fluidité de la bicouche elle-même, dans ses différentes phases. Les résultats sont présentés ci-dessous dans le graphe 42.

L'incorporation de tCFA15 dans la bicouche induit :

- une diminution relativement importante de l'anisotropie de fluorescence du DPH dans la phase gel de la bicouche, aux températures inférieures à la température de transition de phase  $T_m$ . (→) entre phase gel et phase cristal liquide.
- Une diminution également importante de cette température de transition de phase (←)

Ces deux observations montrent clairement que le tCFA15, molécule lipophile, est effectivement incorporé dans la bicouche de DPPC puisque sa seule présence perturbe fortement cette bicouche.

- Une augmentation relativement faible, mais reproductible de l'anisotropie de fluorescence du DPH dans la phase cristal liquide de la bicouche, aux températures supérieures à  $T_m$ . (→). C'est ce résultat que nous mettrons en exergue, car une membrane **biologique** ne peut se concevoir que dans la phase cristal liquide, et en aucun cas dans une phase gel



Graphe 42 : Variation de l'anisotropie de fluorescence du DPH dans des vésicules suite à l'incorporation du tCFA15 à 5% ou 10%.

On peut supposer que l'effet antioxydant du tCFA15 soit relié indirectement à cette diminution de la fluidité d'une bicouche phospholipidique en phase cristal liquide, qui rendrait plus difficile l'attaque des radicaux et leur pénétration dans la cellule. Cette hypothèse est cependant à relativiser vu le fort ratio d'incorporation du tCFA15 dans cette série d'expériences par rapport à celui existant vraisemblablement *in vivo*.

## V. PROPRIETES BIOLOGIQUES DU tCFA15

### A. Le tCFA15 peut stimuler la croissance axonale sur milieu inhibiteur

L'étude effectuée sur des neurones corticaux d'embryons de souris au stade E15 (15<sup>e</sup> jour de gestation) indique que :

- le tCFA15 est capable de promouvoir la croissance axonale en doublant la longueur de l'axone à une concentration de  $10^{-7}$ M.
- l'effet promoteur du tCFA15 est spécifique à l'axone. Les prolongements dendritiques ne sont pas concernés.
- l'effet inhibiteur de la Sema3A est antagonisé par le tCFA15 à  $10^{-7}$ M.
- l'effet inhibiteur des protéines de la myéline (Nogo A, MAG, OMgp) est aussi antagonisé par le tCFA15 à  $10^{-7}$ M.

Suite à ces résultats intéressants, il devient essentiel d'élucider le mode d'action du tCFA15 sur la croissance axonale des neurones.

### B. Cascade intracellulaire cible du tCFA15

#### 1. Inhibitions de multiples voies internes

Pour étudier le mode d'action du tCFA15, nous avons inhibé de nombreuses voies de signalisations intracellulaires de manière à voir que l'inactivation d'une de ces voies est capable d'abolir l'effet du tCFA15. Nous avons procédé à l'inhibition des :

- tyrosine kinases
- MAP kinases
- des voies de nucléotides cycliques
- Ser/Thr kinases

L'inhibition de ces voies de signalisation produit un même effet antagonistique sur l'action du tCFA15. Ce résultat nous a suggéré que le composé agit de manière non-spécifique sur de nombreuses cibles intracellulaires.

#### 2. Effet sur la phosphorylation de Cdk-5

La phosphorylation de la Cdk-5 (Cyclin-dépendant kinase 5) est liée au collapsus du cône de croissance engendré par la Sema3A. Nous avons étudié l'effet du tCFA15 sur la phosphorylation de Cdk-5.

Cette étude nous a montré que le tCFA15 n'agit pas sur cette phosphorylation, ce qui suggère que le tCFA15 n'agit pas en aval du récepteur de la Sema3A. Il exerce son effet biologique probablement en activant des voies parallèles qui pourraient induire la croissance nerveuse.

### 3. Inhibition des monooxygénases à flavoprotéines.

L'utilisation d'un inhibiteur des flavoprotéines monooxygénase diminue l'effet promoteur du tCFA15 sur la croissance axonale. Ceci montre que le léger effet antioxydant du tCFA15 pourrait être à l'origine de son effet biologique.

Cet effet antioxydant étant de nature indirect, un effet direct du pouvoir antioxydant pourrait être bénéfique pour l'activité biologique du tCFA15.

## VI. CONCLUSION

L'effet biologique du tCFA15 sur la régénérescence axonale pourrait avoir des retombées biomédicales importantes. Cependant, l'absence d'une réelle activité antioxydante serait ressentie au sein de la cicatrice gliale ou une forte génération de radicaux libres est observée. Nous nous sommes donc proposés de synthétiser des produits qui auraient des activités biologiques identiques à celles du tCFA15 tout en possédant une activité antioxydante accrue. Nous avons choisi comme cible le noyau antioxydant quinonique de part sa structure proche de celle du tCFA15.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Girlanda-Junges, C.; Lutz-Bucher, B.; Gonzalez de Aguilar, J. L.; Loeffler, J. P.; Luu, B. 3-(15-Hydroxypentadecyl)-2,4,4-trimethyl-2-cyclohexen-1-one and its effect on neuropeptide secretion. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2537-2539.
- (2) Luu, B.; Neuberg, P.; Trancard, D.; Yamada, M.; Oshiba, Y. et al. Process for producing cyclohexenone long chain fatty alcohols, 2004, WO2004087630.
- (3) Tziveleka, L. A.; Kourounakis, A. P.; Kourounakis, P. N.; Roussis, V.; Vagias, C. Antioxidant potential of natural and synthesised polyprenylated hydroquinones. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 935-939.
- (4) Poeggeler, B.; Thuermann, S.; Dose, A.; Schoenke, M.; Burkhardt, S. et al. Melatonin's unique radical scavenging properties - roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J. Pineal Res.* **2002**, *33*, 20-30.
- (5) Tomasetti, M.; Littarru, G. P.; Stocker, R.; Allewa, R. Coenzyme Q10 enrichment decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Biol Med* **1999**, *27*, 1027-1032.
- (6) Houbre, D.; Schindler, P.; Trifilieff, E.; Luu, B.; Duportail, G. Selectivity of lipid-protein interaction with myelin proteolipids PLP and DM-20. A fluorescence anisotropy study. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1029*, 136-142.