

Université de Montréal

Étude de l'effet neuro-protecteur de polyphénols issus de la Pomme-Grenade ainsi que de leurs dérivés métaboliques

Par
Constantin Bretonneau

Département de Neurosciences
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
En vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc)

Janvier 2019

© Constantin Bretonneau

Université de Montréal
Département de Neurosciences, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

Étude de l'effet neuro-protecteur de polyphénols issus de la Pomme-Grenade ainsi que de leurs dérivés métaboliques

Présenté par
Constantin Bretonneau

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Martine Tétreault
Président-rapporteur

Dr Christopher Rose
Membre du jury

Résumé

De nos jours, on attribue une myriade d'effets bénéfiques aux polyphénols alimentaires. Ces affirmations reposent la plupart du temps sur des études *in vitro*, sur quelques études *in vivo* et presque jamais sur des essais cliniques. On se rend compte de plus en plus que l'intérêt des polyphénols ne résiderait pas uniquement dans leur pouvoir antioxydant mais également dans leur capacité à cibler de multiples cibles moléculaires comme l'inflammation. De plus, de nombreuses études commencent à prendre en compte la biodisponibilité des polyphénols dans l'organisme et leur interaction avec le microbiote intestinal. C'est pourquoi en plus de nous intéresser à deux polyphénols issus de la Pomme-grenade, nous nous sommes intéressés à deux de leurs dérivés métaboliques. Pratiquement aucune étude ne s'était penchée sur l'effet de ces molécules dans un contexte de maladies neuro-dégénératives. Pour se faire, nous avons testé la punicalagine, l'acide ellagique, l'urolithin A et l'urolithin B sur des modèles *C. elegans* de la SLA et de la maladie de Huntington qui présentaient des phénotypes moteurs, de la neuro-dégénérescence et de l'inflammation. Enfin, nous avons utilisé un modèle de souris ayant subi une axotomie du nerf optique pour confirmer le pouvoir neuro-protecteur de l'urolithin A. Nos résultats ont montré que ces composés dans des proportions différentes étaient en mesure de réduire la toxicité neuronale de protéines liées à la SLA et HD et ainsi diminuer les niveaux de paralysie et de neuro-dégénérescence de nos modèles *C. elegans*. En parallèle, nous avons observé que cette neuro-protection se faisait au travers une diminution de l'inflammation et pour l'urolithin A une amélioration de la morphologie des mitochondries via la mitophagie. En dernier, nous avons constaté que l'urolithin A était en mesure de promouvoir la survie neuronale chez la souris à la suite d'une lésion du nerf optique. Pour conclure, cette étude par son approche *in vivo* de multiples maladies neuro-dégénératives renforce les preuves existantes de l'effet bénéfique de la consommation de Pomme-grenade et encourage l'utilisation pharmacologique de l'urolithin A.

Mots-clés : Maladies neuro-dégénératives, Pomme-grenade, Polyphénols, Dérivés métaboliques, Neuro-protection.

Abstract

Nowadays, a myriad of beneficial effects is attributed to dietary polyphenols. Most of these claims are based on in vitro studies, some in vivo studies, and almost never on clinical trials. It is increasingly realized that the interest of polyphenols does not only lie in their antioxidant power but also in their ability to target multiple molecular pathways such as inflammation. In addition, many studies are beginning to take into account the bioavailability of polyphenols in the body and their interaction with the gut microbiota. That's why in addition to two polyphenols from Pomegranate, we looked at two of their metabolic derivatives. Almost no study has examined the effect of these molecules in the context of neurodegenerative diseases. To do this, we tested punicalagin, ellagic acid, urolithin A and urolithin B on *C. elegans* models of ALS and Huntington's disease that had motor phenotypes, neurodegeneration and inflammation. Furthermore, we used a mouse model that underwent an axotomy of the optic nerve to confirm the neuroprotective power of urolithin A. Our results showed that these compounds in different proportions were able to reduce the neuronal toxicity of proteins related to ALS and HD and thus decrease the levels of paralysis and neuro-degeneration of our *C. elegans* models. In parallel, we observed that this neuroprotection was done through a reduction of the inflammation and for urolithin A an improvement of the morphology of mitochondria via mitophagy. Lastly, we found that urolithin A was able to promote neuronal survival in mice as a result of optic nerve injury. To conclude, this study by its in vivo approach to multiple neuro-degenerative diseases reinforces existing evidence of the beneficial effect of pomegranate consumption and encourages the pharmacological use of urolithin A.

Keywords : Neuro-degenerative diseases, Pomegranate, Polyphenols, Metabolic derivatives, Neuroprotection.

Table des matières

Résumé.....	I
Abstract.....	II
Table des matières.....	III
Liste des figures.....	V
Liste des tableaux.....	VI
Liste des annexes.....	VII
Liste des sigles et abréviations.....	VIII
Remerciements.....	IX
Introduction.....	10
Sclérose latérale amyotrophique.....	10
Description.....	10
Symptômes.....	11
Génétique.....	11
Caractéristiques pathologiques.....	12
Modèles <i>C. elegans</i>	13
Chorée de Huntington.....	14
Description et symptômes.....	14
Caractéristiques pathologiques.....	15
Modèles <i>C. elegans</i>	15
Composés naturels et dérivés métaboliques.....	16
Polyphénols.....	16
Études épidémiologiques.....	17
Études in vitro et in vivo.....	18

Essais cliniques	19
Barrière hémato encéphalique.....	19
But de cette étude	21
Matériel et Méthodes	22
Résultats.....	28
Discussion	43
Conclusion et Perspectives	49
Bibliographie	50
Annexes	X

Liste des figures

Figure 1 : Les extraits de Pomme-grenade et leurs dérivés métaboliques réduisent la neuro toxicité de FUS.

Figure 2 : Les extraits de Pomme-grenade et leurs dérivés réduisent la neuro-toxicité de HAR-1.

Figure 3 : Les extraits de Pomme-grenade et leurs dérivés métaboliques protègent contre la toxicité des répétitions de polyQ.

Figure 4 : Les effets bénéfiques des extraits de Pomme-grenade et de leurs dérivés métaboliques ne dépendent pas de l'agrégation.

Figure 5 : L'Urolithin A protège les cellules ganglionnaires de la rétine d'une mort induite par axotomie.

Figure 6 : Les extraits de Pomme-grenade et leurs dérivés augmentent légèrement l'espérance de vie.

Figure 7 : L'effet bénéfique de l'Urolithin A est dépendant du processus de mitophagie.

Figure 8 : Les extraits de Pomme-grenade et leurs dérivés n'ont pas d'effets sur les voies de résistance au stress chez *C. elegans*.

Liste des tableaux

Tableau 1. Les différentes souches *C. elegans* utilisées

Liste des annexes

Annexe 1 : Structure chimique de PU, EA, UA et UB

Annexe 2 : Revue des études réalisées avec PU, EA, UA et UB

Annexe 3 : Les extraits de Pomme-grenade deviennent toxiques à haute concentration mais pas leurs dérivés métaboliques.

Liste des sigles et des abréviations

EA : Acide Ellagique

HD : Maladie de Huntington

HTT : Huntingtin

PU : Punicalagine

RNAi : RNA interference

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique

SLAf : Sclérose Latérale Amyotrophique familiale

SLAs : Sclérose Latérale Amyotrophique sporadique

UA : Urolithin A

UB : Urolithin B

Remerciements

Ces deux années de maîtrise auront été pour moi un vrai challenge ponctué d'échecs, de réussites, de joies et de peines. Je n'aurais certainement pas pu compléter ce diplôme sans le soutien d'un certain nombre de personnes que je tiens à remercier.

En premier lieu, je tiens particulièrement à remercier mon directeur de recherche le Dr Alex Parker de m'avoir fait confiance et permis d'intégrer son laboratoire. Je lui suis extrêmement reconnaissant pour son soutien, ses conseils précieux ainsi que pour tous les congrès scientifiques auxquels j'ai pu participer.

Pour continuer, cette maîtrise n'aurait pas été la même sans la présence de trois personnes : Audrey, James et Gilles (le Hugh Jackman portugais). Je ne saurais leur exprimer toute ma gratitude pour tout ce qu'ils ont fait pour moi. Je leur dois énormément et je tiens à dire que j'admire leur rigueur, leur intégrité et leur force de travail et que j'ai essayé tant bien que mal de suivre leur exemple.

Je souhaite évidemment remercier tous les autres membres du laboratoire que j'ai pu côtoyer : Julie, Kathrin, Yasmin, Sulin, Prateep et Emilien. Merci pour leur aide, leurs conseils et les nombreuses discussions que nous avons pu avoir. Merci à Sarah Peyrard et Claudia Maios sur qui on peut toujours compter en cas de besoin. Et également merci à toute l'équipe Vande Velde en particulier Yousra (la reine du développé couché) et Hadjara pour leur bonne humeur, leur joie de vivre et leur amitié.

Pour finir, mon séjour canadien aurait certainement tourné court sans le soutien indéfectible de ma famille. Merci à eux de me soutenir et m'accompagner dans mes projets.

Introduction

Sclérose Latérale Amyotrophique

Description

La SLA est une maladie neuro-dégénérative qui se caractérise par une dégénération progressive des motoneurones au niveau du cerveau et de la moelle épinière. Elle fut pour la première fois décrite par Jean-Martin Charcot en 1869. Son nom tient de la dégénérescence de motoneurones engendrant un tissu cicatriciel (Sclérose), au niveau de la partie latérale de la moelle épinière (Latérale) et de la diminution de la masse musculaire induite par la mort neuronale et la perte des jonctions neuromusculaires (Amyotrophique). On la nomme également maladie de Lou Gehrig, maladie de Charcot ou encore maladie des motoneurones. Les premiers symptômes sont de légères crampes musculaires et une faiblesse au niveau des membres inférieurs et supérieurs. Ils progressent ensuite vers une paralysie de l'ensemble des muscles squelettiques ce qui mène inévitablement à la mort. La SLA se développe à l'âge adulte, en moyenne entre 50 et 60 ans et touche environ 5 personnes sur 100 000. L'espérance de vie après le diagnostic ne dépasse pas 3 à 5 ans et les seuls traitements actuellement disponibles le Riluzole et l'Édaravone ne prolongent la vie que de quelques mois. Le Riluzole (2-Amino-6-(trifluorométhoxy)-benzothiazole) est un médicament qui inhibe la libération du glutamate au niveau des synapses et inactive les canaux sodium voltage-dépendent (1). Toutefois, son mécanisme d'action précis dans la SLA reste encore inconnu. L'Édaravone (1-Phényl-3-méthyl-5-pyrazolone) quant à lui est un antioxydant qui réduit le stress oxydatif. Son mécanisme d'action dans le cadre de la SLA est également inconnu pour le moment (2). On estime que 90% des cas seraient sporadiques, c'est-à-dire sans aucun antécédent dans la famille et 10% seraient familiaux. Depuis plusieurs années, certains gènes mutés ont été identifiés comme pouvant causer la SLA et leur cas sera détaillé ci-dessous. Toutefois, les causes de la SLA restent encore majoritairement inconnues même s'il est très vraisemblable que des facteurs environnementaux soient impliqués.

Symptômes

La SLA se caractérise par des signes de dégénérescence des neurones moteurs centraux et périphériques (3) qui se traduisent par une atrophie musculaire et une perte du contrôle volontaire du mouvement (4). Le site où les symptômes peuvent être observés pour la première fois varie énormément d'un patient à un autre et cela a une influence sur le pronostic vital (5). On peut ainsi classer la SLA en deux formes cliniques, la forme bulbaire et la forme spinale.

Forme Bulbaire

Cette forme comprend une altération des muscles respiratoires, du larynx, pharynx et de la trachée. Cela s'accompagne de difficultés à avaler et à parler (6). Il est possible de développer les premiers symptômes au niveau bulbaire, mais d'ensuite évoluer en forme spinale avec apparition de problèmes moteurs des membres supérieurs et inférieurs. Toutefois ce n'est pas toujours le cas. La forme purement bulbaire touche plus souvent les femmes et est associée à un meilleur pronostic que celui de la forme spinale (7).

Forme spinale

Dans les cas où les premiers symptômes sont spinaux, on observe une dégénérescence des neurones moteurs au niveau de la moelle épinière et du cortex. Cela se manifeste par une paralysie progressive de tous les muscles à l'exception de ceux au niveau oculomoteur qui sont relativement préservés (8). Les patients atteints ont des difficultés à marcher, une faiblesse musculaire progressive, sans atteinte aux nerfs sensitifs. Il y a également apparition progressive de symptômes bulbaires avec des difficultés à parler, à avaler et à respirer.

La génétique

Actuellement, des mutations dans plus d'une douzaine de gènes ont été identifiées comme étant capable d'induire la SLA et se transmettraient le plus fréquemment par hérédité autosomale dominante. En 1993, la première mutation fut découverte dans le gène *SOD1*

(*Cu/Zn superoxide dismutase*). *SOD1* représente 10 à 20% des cas familiaux (SLAf) et 1 à 2% des cas sporadiques (SLAs) (9). Par ailleurs, les cellules de patients sont souvent caractérisées par la présence d'inclusions protéiques. La nature de ces inclusions est restée inconnue jusqu'en 2006, lorsqu'il fut découvert que celles-ci étaient en majorité composées de protéines TDP-43 ubiquitinées (*TAR DNA Binding Protein 43*) et représente 4% SLAf et 1% SLAs (10). Ces inclusions de TDP-43 sont également retrouvées chez les patients atteints de FTD ou d'autres maladies neuro-dégénératives. Enfin, en 2011 fut découvert la principale cause génétique de la SLA (25 à 40% SLAf et 7% SLAs) : une expansion de répétitions de G₄C₂ dans le premier intron du gène *C9orf72* (*open reading frame 72 on chromosome 9*) (11). Il n'est pas encore clair si l'expansion de répétitions dans *C9orf72* entraîne une neuro-dégénération via un gain de fonction toxique, une perte de fonction ou bien les deux. Ces gènes avec *FUS/TLS* (*fused in sarcoma / translocated in sarcoma*), 5% SLAf et 1% SLAs sont les principales causes génétiques de la SLA (12, 13). Dans des cas plus rares on retrouve d'autres gènes mutés comme *CHCHD10* (*coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10*), *TUBA4A* (*tubulin, alpha 4A*), *TBK1* (*TANK-binding kinase 1*), *OPTN* (*optineurin*), *UBQLN2* (*ubiquilin-2*), *VCP* (*valosin-containing protein*), *PFN1* (*profilin-1*), *ALS2* (*alsin*), *SETX* (*senataxin*), *ANG* (*angiogenin*), *MATR3* (*matrin-3*), *hnRNPA1* (*heterogeneous ribonucleoprotein A1*), *hnRNPA2/B1* (*heterogeneous ribonucleoprotein A2/B1*) et *NEK1* (*NIMA Related Kinase 1*).

Les caractéristiques pathologiques

En plus des motoneurones, d'autres types cellulaires contribuent à la pathogenèse de la SLA. Des inclusions de TDP-43 sont observées dans la glie et les neurones du cortex moteur, mais également dans le tronc cérébral, la moelle épinière et dans la substance blanche (14). Sur la base de l'observation d'inclusions de protéines dans les cellules gliales entraînant une activité anormale des microglies ainsi que de la neuro-inflammation. Il y aurait une « non-cell autonomous toxicity » qui contribue à la SLA (15). C'est-à-dire qu'il y aurait un dysfonctionnement de différents types de cellules.

Les agrégats de protéines sont une caractéristique des maladies neuro-dégénératives. Dans le cas de la SLA, TDP-43 est le constituant principal des agrégats observés dans les motoneurones (10). Mais on retrouve également des agrégats de protéines contenant FUS, p62, *SOD1*, UBQLN2 et C9orf72 dans des tissus post-mortem. On les observe dans les neurones du cortex moteur, du tronc cérébral et de la moelle épinière, ainsi que dans les cellules gliales. Cependant, il n'est pas encore clair si ces agrégats sont toxiques ou protecteurs. De nombreuses protéines trouvées dans les agrégats ainsi que les protéines codées par certains gènes de la SLA se sont révélées participer l'homéostasie protéique et pourraient donc affecter la formation et / ou l'élimination de ces agrégats (16). Une homéostasie anormale des protéines est une marque de nombreuses maladies neuro-dégénératives, il est donc difficile de savoir si cela est spécifique à la SLA ou bien constitue une caractéristique de la mort neuronale liée à l'âge.

Modèles *C. elegans*

Afin d'étudier la SLA in-vivo, notre laboratoire a fait le choix de l'organisme modèle *Caenorhabditis elegans*. Celui-ci est un nématode de 1 mm présentant de nombreux avantages. Pour commencer, *C. elegans* est hermaphrodite avec un cycle de vie de 30 jours en moyenne. Il se cultive dans des boîtes de Petri en présence d'un milieu nutritif et se nourrit de bactéries *E. coli* OP50. Il est donc possible de générer un très grand nombre de vers rapidement et à faible coût. Ensuite, *C. elegans* est le premier organisme vivant à avoir eu son génome entièrement séquencé. L'ensemble de ses gènes ont été cartographiés et il existe un ou plusieurs variants pour chacun d'entre eux. Les manipulations génétiques sont relativement simples, knock-out, knock-in et knock-down. Il y a 35% d'homologie entre les gènes du *C. elegans* et ceux présents chez l'humain. Ce qui est une caractéristique importante pour l'étude des maladies humaines. Pour continuer, le *C. elegans* est un organisme transparent dans lequel on peut observer les structures internes in-vivo. Enfin, dans le cadre de l'étude de maladies neuro-dégénératives, le système nerveux de 302 neurones du *C. elegans* a entièrement été caractérisé.

Dans le laboratoire, nous utilisons des modèles transgéniques c'est-à-dire des modèles où une ou plusieurs copies d'un gène humain lié à la SLA ont été insérées dans le génome du *C. elegans*. Le transgène est ensuite exprimé sous le contrôle d'un promoteur spécifique à une région donnée (motoneurones, muscles, intestin, pharynx, etc.). Nous utilisons également des modèles non transgéniques. Les gènes humains liés à la SLA ont des orthologues chez *C. elegans*. Il est à noter qu'aucun modèle ne peut représenter tous les aspects d'une maladie.

Voici les principales caractéristiques des modèles FUS^(S57Δ), *har-1*(gk3124) et *har-1*(ad2155) (orthologue du gène CHCHD10) qui ont été utilisés dans la présente étude :

- Une neuro-dégénérescence progressive des motoneurones GABAergiques après 6 jours de vie adulte
- Apparition d'un phénotype moteur à partir du 6^{ème} jour de vie adulte se traduisant par une paralysie progressive
- Une espérance de vie réduite

On retrouve donc les mêmes caractéristiques que chez l'humain. Apparition des symptômes à l'âge adulte, neuro-dégénérescence et paralysie progressive ainsi qu'une espérance vie réduite.

Chorée de Huntington

Description et symptômes

HD est une maladie neuro-dégénérative transmise de manière autosomique dominante. Elle est la conséquence d'une expansion de répétitions de CAG dans le gène *huntingtin* (HTT), contenu dans le chromosome 4 (17). La région N-terminale de la protéine mutante (mHTT), se retrouve donc avec une expansion de glutamine (polyQ). Cette présence importante de glutamine conduit à un mauvais repliement de la protéine et à l'incapacité pour la cellule de traiter celle-ci correctement. Ainsi, mHTT acquiert un gain de fonction toxique menant à des dysfonctionnements cellulaires, la formation d'inclusion, de l'astroglie et une atrophie du cerveau (18). En général, les individus non atteints ont moins de 36 répétitions de glutamine dans leur gène *huntingtin* (HTT). Et c'est à partir de 40 répétitions ou plus que les

individus développent la maladie. Il est à noter, que le nombre de répétitions de CAG est directement lié à l'âge d'apparition des symptômes. Et que les patients ayant un nombre exceptionnellement élevé de répétitions ont la forme juvénile de HD. Bien que de nombreuses régions cérébrales soient touchées, le striatum et le cortex sont les régions les plus touchées. Les symptômes développés par les patients ont un impact dévastateur sur leur qualité de vie. Pour commencer, il y a des symptômes moteurs qui incluent des mouvements involontaires, une démarche anormale et une difficulté de parole et de déglutition. Pour continuer, il y a des changements de personnalité définis par de grands sauts d'humeur, de l'agressivité, de l'anxiété et de la dépression. Pour finir, il y a un déclin cognitif qui se caractérise par un dysfonctionnement de la mémoire à long et à court terme (4). La maladie de Huntington est invariablement mortelle et les patients succombent généralement 10 à 15 ans après diagnostic. Présentement, tous les traitements pour HD sont des traitements palliatifs et il est donc primordial de trouver de nouvelles solutions thérapeutiques. Pour se faire, les stratégies visant l'inhibition de l'expression du gène *huntingtin* suscitent beaucoup d'intérêt.

Les caractéristiques pathologiques

Plusieurs mécanismes intracellulaires sont impliqués dans la neuro-dégénération observée dans HD. Pour commencer, il y a une interférence dans la transcription protéique ce qui entraîne la sur-expression ou la sous-expression de protéines indispensable aux neurones. Il y a également, une perturbation du cytosquelette qui engendre un transport défaillant des organelles et des vésicules. Pour continuer, il y a un mauvais repliement des protéines et les systèmes de dégradation des protéines n'arrivent pas à tagger toutes les protéines agrégées. On observe une altération de la dynamique des mitochondries qui provoque un stress oxydatif très important. Pour terminer, il y a une excitotoxicité liée à la perturbation de l'homéostasie du calcium.

Modèles *C. elegans*

Dans la présente étude, nous avons utilisé exclusivement des modèles transgéniques car le *C. elegans* n'a pas de gène orthologue au gène humain *huntingtin*. Ces modèles expriment des répétitions plus ou moins longues de glutamines soit au niveau du système nerveux (Q19::CFP et Q67::YFP sous le contrôle du promoteur *rgef-1p*), soit au niveau des muscles (Q35::YFP sous le contrôle du promoteur *unc-54p*) ou bien alors au niveau de l'intestin (Q44::YFP sous le contrôle du promoteur *vha-6p*). Voici les principales caractéristiques de ces souches :

- Q67::YFP développe une paralysie progressive à partir du 6^{ème} jour de vie adulte ainsi que de la neuro-dégénérescence. Observations que ne l'on retrouve pas chez les vers exprimant Q19::CFP. Cela représente bien la neuro-toxicité de longues répétitions de glutamine.
- Les modèles Q35::YFP et Q44::YFP sont utiles car on peut y observer des agrégats. Il est donc ensuite possible d'étudier l'effet de diverses molécules sur ceux-ci.

Composés naturels et dérivés métaboliques

L'existence d'une relation entre nutrition et santé humaine est connue depuis plusieurs siècles maintenant. Cette relation a mené à la découverte des vitamines et des minéraux qui sont à ce jour considérés comme des éléments nutritifs essentiels. De plus, les végétaux produisent des molécules phytochimiques qui ne sont pas considérées comme essentielles nutritionnellement parlant mais pourraient influencer la santé humaine et le développement de maladies neuro-dégénératives. Enfin, si les effets bénéfiques d'une alimentation riche en fruits et légumes ont été mis en lumière par des études épidémiologiques ([19-22](#)), il émerge maintenant que certains de ces effets seraient spécifiquement dus à des composés phytochimiques et aux métabolites issus de leur digestion.

Polyphénols

Parmi les molécules produites au sein du règne végétal, les polyphénols représentent le plus grand groupe de métabolites secondaires et sont caractérisés par la présence d'au moins un groupe hydroxyle (-OH) attaché à un anneau aromatique (23). Les polyphénols représentent un groupe de molécules extrêmement diversifié non seulement en terme de structure chimique mais également en terme d'activité biologique. Les polyphénols sont généralement conjugués à des polysaccharides, acides organiques et carboxyliques, amines, lipides et à d'autres phénols. Ainsi, il existe une classification des polyphénols en différents sous-groupes en fonction du nombre de phénols présents et des éléments attachés à ceux-ci (23, 24). Les principaux groupes sont les acides phénoliques, stilbènes, flavonoïdes, coumarines et lignanes. On les retrouve principalement dans les fruits, légumes et noix dans des concentrations très variées.

Études épidémiologiques

Des études épidémiologiques et de populations ont mis en évidence les effets bénéfiques d'une consommation régulière de polyphénols. La plupart de ces études se sont intéressées à la diète méditerranéenne qui se caractérise par une grande consommation de fruits, légumes, poissons ainsi que d'une consommation moindre de vin et d'huile d'olive qui sont des éléments riches en polyphénols (25). Ces études ont démontré l'existence d'une corrélation positive entre une diète méditerranéenne et une diminution du risque de développer une maladie neuro-dégénérative. Plus encore, elles ont observé un retard dans l'âge d'apparition de maladies telles qu'Alzheimer et Parkinson ainsi qu'une diminution de la mortalité chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer (26-28). Les quantités importantes de polyphénols dans la diète méditerranéenne semblent indiquer que ceux-ci contribuent à ses effets bénéfiques. Plus généralement, des études ont démontré qu'une diète riche en polyphénols améliore la cognition, la mémoire et l'apprentissage chez des personnes âgées (29, 30), qu'il y a une corrélation entre une concentration élevée en polyphénols dans l'urine et un risque plus faible de déclin cognitif (31, 32) ou encore que la consommation de myrtille améliore les fonctions cognitives chez des personnes âgées (33, 34). Collectivement,

ces études soutiennent l'hypothèse qu'une alimentation riche en polyphénols a un impact positif vis-à-vis de la cognition et des maladies neuro-dégénératives.

Études in-vitro et in-vivo

Les études in-vitro sont particulièrement pertinentes pour déterminer les propriétés chimiques d'un polyphénol ainsi que son effet spécifique dans le cadre d'un processus pathologique sans l'interférence d'autres voies cellulaires. Toutefois, les résultats doivent être interprétés avec précaution car certains ne peuvent être reproduits dans des modèles animaux. En effet, pendant un certain nombre d'années, les études sur les polyphénols se sont concentrées sur l'hypothèse que ceux-ci exercent un effet bénéfique en agissant en tant qu'antioxydants c'est-à-dire en éliminant les radicaux libres. Toutefois, ces études avaient tendance à utiliser des concentrations non-physiologiques de l'ordre du micro-molaire alors que les polyphénols semblent avoir un effet sur les modèles animaux et chez l'humain avec des doses en circulation de l'ordre du nano-molaire. Il est aujourd'hui reconnu que le mode d'action des polyphénols ne se résume donc pas uniquement à leur activité anti-oxydante et qu'ils ont également des propriétés anti-inflammatoires, anti-agrégatives ou encore anti-prolifératives. Les études in-vitro ont ainsi mis en lumière que lorsque que leur concentration est élevée les polyphénols ont des capacités anti-oxydantes. Ce qui a mené à l'idée fausse que leurs effets protecteurs étaient principalement dus à la réduction du stress oxydatif. Toutefois, les études avec des modèles cellulaires et animaux ont depuis montré que le mode d'action des polyphénols va bien au-delà de leur potentiel antioxydant. La neuro-dégénérescence étant un processus impliquant plusieurs facteurs, la capacité des polyphénols à moduler plusieurs de ces facteurs comme l'inflammation et le stress oxydatif les rend particulièrement attrayant. En général, les études in vivo ont soit utilisé une approche nutritionnelle soit une approche pharmacologique. C'est-à-dire que soit les animaux étaient nourris avec des aliments contenant des polyphénols (exemple des bleuets) et ceux-ci devaient franchir la barrière gastro-intestinale et être métabolisés par le microbiote. Soit les composés phénoliques étaient administrés par intraveineuse ou autre et on parlait alors d'approche pharmacologique.

Essais cliniques

Il y a peu d'essais cliniques qui ont étudié l'effet de polyphénols sur des maladies neuro-dégénératives. Le *G. biloba* qu'on nomme plus communément le Ginkgo n'a montré aucun effet à long terme sur l'accumulation de plaque A β . (35) mais a eu des résultats positifs dans le cadre d'accident vasculaire cérébraux et chez des enfants avec des troubles de l'attention (36, 37). D'autre part, une autre étude a montré que la consommation régulière de jus de bleuets améliorerait la mémoire chez des personnes âgées (38). La majorité des essais étudient donc l'effet des polyphénols sur la cognition mais très peu se font dans le cadre de maladies telles qu'Alzheimer, Parkinson, Huntington et la SLA. Même si les essais cliniques sont l'approche la plus sûre pour étudier l'effet physiologique d'une molécule, ils sont généralement très longs et très coûteux.

La barrière hémato-encéphalique

Après ingestion, que ce soit dans l'intestin ou le foie, les polyphénols subissent d'importantes transformations métaboliques. Menant ainsi à la production d'une grande variété de dérivés phénoliques. Toutefois, pour que les polyphénols et leurs dérivés produisent leurs effets neuro-protecteurs au niveau du système nerveux central ceux-ci doivent traverser des barrières et plus particulièrement la barrière hémato-encéphalique. En effet, plusieurs barrières régulent les échanges entre le sang et le système nerveux et la barrière hémato-encéphalique est très certainement celle qui exerce le contrôle le plus important. C'est une barrière extrêmement sélective qui fournit des nutriments au cerveau tout en contrôlant l'accès de métabolites, comme les polyphénols et qui protège également le système nerveux d'éléments toxiques et pathogènes (39). Des études ont démontré que la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique aux polyphénols est liée à leur caractère lipophile. C'est-à-dire que les dérivés moins polaires comme les dérivés méthyles sont d'avantage absorbés par le cerveau comparativement à des dérivés sulfatés par exemple (40). Cependant, il n'est pas

encore clair si les polyphénols traversent principalement la barrière par simple diffusion ou à l'aide d'un transporteur actif. Dans tous les cas, l'accumulation des données démontrant la capacité des polyphénols à traverser la barrière hémato-encéphalique renforce leur potentiel dans le cadre de maladies neuro-dégénératives.

But de cette étude

Cette étude avait pour objectif d'explorer l'effet neuro-protecteur de polyphénols issus de la Pomme-grenade ainsi que de leurs dérivés métaboliques. La structure chimique de chacun des composés est en **annexe 1** et une revue d'études déjà réalisées avec ces mêmes composés est en **annexe 2**. Dans le cas présent, nous avons souhaité travailler avec plusieurs modèles *C. elegans* de la SLA et de la maladie de Huntington puis avec un modèle de lésions axonales chez la souris. Le but étant de déterminer si la neuro-protection était spécifique à une seule maladie ou à une seule sous-population de neurones et enfin si la neuro-protection était conservée lors du passage d'un modèle animal simple à un modèle plus complexe. Dans un deuxième temps, nous avons souhaité étudier si nos molécules d'intérêts influençaient l'inflammation et l'espérance de vie et si leur effet était dépendant de l'autophagie et les voies cellulaires de résistance aux stress.

Matériel et Méthodes

Souches *C. elegans*

Les méthodes standards de culture et manipulation des *C. elegans* ont été utilisées (41). Les vers ont été maintenus sur des boîtes de Petri NGM (Nematode Growth Media) préalablementensemencées avec des bactéries *E. coli* OP50 et ont été conservés à 15°C sauf indication contraire. Les souches utilisées proviennent du *C. elegans* Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis) ou ont été générées au sein même du laboratoire. Toutes les souches mutantes ont été croisées au moins 6 fois avec la souche Wild-type N2.

Tableau 1. Les différentes souches *C. elegans* utilisées

Souche	Génotype	Description
N2	Wild-type	
XQ471	<i>unc-47p::FUS^(WT);unc-119(+)</i>	Exprime le transgène FUS ^(WT) uniquement dans les motoneurones GABAergiques
XQ472	<i>unc-47p::FUS^(S57A);unc-119(+)</i>	Exprime le transgène FUS ^(S57A) uniquement dans les motoneurones GABAergiques
VC3169	<i>har-1(gk3124)</i>	Souche ayant une mutation knock-out du gène <i>har-1</i> (déletion de 260 paires de base) qui est un orthologue du gène CHCHD10
DA2155	<i>har-1(ad2155)</i>	Souche ayant une point mutation du gène <i>har-1</i> (substitution de G par A) qui est un orthologue du gène CHCHD10
AM44	<i>rmIs284[rgef-1p::Q67::YFP]</i>	Exprime une répétition de 67 glutamines fusionnée à YFP au niveau du système nerveux
AM49	<i>rmIs172 [rgef-1p::Q19::CFP]</i>	Exprime une répétition de 19 glutamines fusionnée à CFP au niveau du système nerveux
AM140	<i>rmIs132 [unc-54p::Q35::YFP]</i>	Souche exprimant une répétition de 35 glutamines au niveau des muscles
GF80	<i>drIs20 [vha-6p::Q44::YFP + rol-6(su1006) + pBluescript II]</i>	Répétition de 44 glutamines fusionnée à YFP exprimée spécifiquement au niveau de l'intestin
IG274	<i>frIs7[nlp-29p::GFP,col-12p::DsRed]</i>	Souche exprimant GFP suite à une infection, une blessure ou un stress osmotique
PS6192	<i>syIs243 [myo-3p::TOM20::mRFP + unc-119(+)+ pBS Sk+]</i>	Souche permettant de visualiser la structure des mitochondries dans les muscles de la paroi grâce à la protéine fluorescente mRFP qui est envoyée dans la matrice mitochondriale
SJ4100	<i>zcIs13[hsp-6::GFP]</i>	Exprime GFP en cas de stress mitochondrial
SJ4005	<i>zcIs4 [hsp-4::GFP]</i>	Souche sur-exprimant la protéine GFP suite à un stress du réticulum endoplasmique
TJ375	<i>gpIs1 [hsp-16.2p::GFP]</i>	Exprime GFP après un choc thermique
CL2166	<i>dvIs19 [(pAF15)gst-4p::GFP::NLS]</i>	La protéine fluorescente GFP est exprimé lorsqu'il y a un stress oxydatif
TU3311	<i>uIs60 [unc-119p::YFP + unc-119p::sid-1]</i>	Souche ayant les neurones hypersensibles à l'ARN interférent (RNAi)

Traitement pharmacologique

À la réception des composés : Punicalagine (Santa Cruz), Acide Ellagique, Urolithin A et Urolithin B (Cedarlane) ceux-ci ont été aliquotés en solution stock de 10mM dans du DMSO. Par la suite, pour chaque condition, le composé a été incorporé à l'agar NGM juste avant d'être coulé dans les boîtes de Petri avec une concentration final de 20 μ M. La condition contrôle étant celle contenant uniquement du DMSO. Les vers ont été exposés aux composés de leur naissance jusqu'à la fin de chaque expérience.

Test de paralysie

Le développement d'une paralysie a été évalué tous les jours pendant 12 jours sur une trentaine de vers transgéniques à partir de leur premier jour de vie adulte. Les vers évoluant sur des boîtes NGM □contrôle□ ou NGM + □composé naturel□ ont été considérés comme paralysés s'ils étaient dans l'incapacité de se mouvoir après un stimulus tactile. Les vers ont été considérés comme morts si toujours après stimulus ils ne montraient aucun signe de mouvement de la tête et du pharynx. Les vers ont été transférés tous les 2 jours sur de nouvelles boîtes de Petri, toutes les expériences ont été réalisées 3 fois de manière indépendante, en triplicata avec \approx 30 vers/boîte et à 20°C.

Test de neuro-dégénérescence

Afin de déterminer in-vivo la présence ou l'absence de dégénérescence au niveau des motoneurones, des vers ayant 9 jours de vie adulte ont été immobilisés sur un pad d'agarose 2% à l'aide de levamisole 5mM dissout dans du M9 puis montés entre lame et lamelle. Un microscope Zeiss Axio Imager M2 et le logiciel Axiovs40 V 4.8.2.0 ont été utilisés pour visualiser la fluorescence mCherry à 595nm. Une centaine de vers ont été évalués par condition.

Test de durée de vie

Pour comparer la durée de vie moyenne et maximale, différentes souches ont été suivies à partir de leur premier jour de vie adulte jusqu'à leur mort. Les vers ont été considérés comme morts s'ils ne montraient aucun mouvement du corps, de la tête et du pharynx après un stimulus tactile. Les vers ont été transférés tous les 2 jours. Toutes les expériences ont été réalisées 3 fois de manière indépendante, en triplicata avec ≈ 30 vers/boîte et à 20°C. L'espérance de vie moyenne correspond au nombre de jours au bout duquel il ne reste plus que 50% de la population en vie. L'espérance de vie maximale est la durée de vie (en jours) maximale observée.

Test RNAi

Les souches traitées avec un ARN interférent (RNAi) ont été nourries avec des bactéries *E. coli* (HT115) contenant soit un vecteur vide soit un clone *bec-1*, *dct-1* ou *skn-1*. Ces clones RNAi provenaient de la ORFeome RNAi Library (Open Biosystems). Tous les modèles *C. elegans* utilisées ont été croisés avec la souche uIs60 [*unc-119p::YFP* + *unc-119p::sid-1*] qui permet un silençage génique spécifique des neurones. Toutes les expériences RNAi ont été réalisées à 20°C et sur des boîtes NGM □contrôle□ ou NGM + □composé naturel□. La paralysie a été évaluée comme décrit précédemment du 1^{er} au 12^{ème} jour de vie adulte.

Quantification de la fluorescence

La quantification de GFP a été réalisée en utilisant un fluorescence multimode plate reader (Biotek, Synergy 4) et des vers ayant 2 jours de vie adulte. Plus précisément, 50 vers par puits et par condition étaient placés dans une plaque-noire 96 puits avant d'être lu 4 fois. Toutes les expériences ont été réalisées 4 fois de manière indépendante pour un total de 200 vers par condition.

Quantification des agrégats

En utilisant *unc-54p::Q35::YFP* et *vha-6p::Q44::YFP*, 100 vers ont été comptés par condition à la recherche d'agrégats.

Évaluation qualitative de la morphologie des mitochondries

Comme précédemment décrit ([42](#), [43](#)), les différentes catégories morphologiques ont été définies de la façon suivante : les vers ayant majoritairement de longues mitochondries interconnectées étaient classifiés comme linéaires. Les vers ayant des mitochondries fragmentées en plus de longues mitochondries interconnectées étaient classifiés comme intermédiaires. Enfin, les vers ayant majoritairement de petites mitochondries étaient classifiés comme fragmentés. L'analyse de la morphologie des mitochondries a été réalisée chez des vers ayant 9 jours de vie adulte pour un total de 100 vers par condition.

Modèle de souris

Toutes les procédures ont été effectuées conformément aux lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux concernant l'utilisation d'animaux de laboratoire (www.ccac.ca). Tous les protocoles ont été approuvés par le Comité de protection des animaux du Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM). Les chirurgies ont été pratiquées sur des souris mâles adultes C57B1 / 6 (18-22 g; Charles River International) sous anesthésie générale (isoflurane 2%, 0,8 L / min). Tous les efforts ont été faits pour minimiser les souffrances des animaux.

Axotomie du nerf optique

Une lésion a été induite par section complète (axotomie) du nerf optique, ce qui a entraîné une perte rapide et prévisible par apoptose des cellules ganglionnaires de la rétine (RCGs) ([44](#)). Pour résumer, une incision dans la peau au-dessus du rebord orbitaire supérieur a été pratiquée pour accéder à l'arrière de l'œil. La gaine durale a été ouverte longitudinalement pour exposer le nerf optique, qui a ensuite été coupé de façon nette à 0,5-1 mm de la tête du

nerf. Nous avons pris soin de ne pas endommager l'artère centrale de la rétine et un examen de l'œil a été effectué avant l'axotomie, immédiatement après et 3 à 5 jours plus tard pour vérifier l'intégrité de la circulation rétinienne après la chirurgie. Tous les animaux présentant un apport sanguin compromis ont été exclus de l'étude.

Injection intra- vitréenne

Un volume total de 5 μ l (100 μ M) d'urolithin A (Cedarlane) a été injectée dans le corps vitré de l'œil à l'aide d'une micro-aiguille affilée sur mesure, fixée à une seringue Hamilton. Sous anesthésie générale, la sclère a été exposée et la pointe de l'aiguille insérée dans le quadrant oculaire supérieur à un angle de 45 ° au travers de la sclère et de la rétine pour atteindre l'espace vitré. Cette voie d'administration évitait les lésions de l'iris ou de la lentille susceptibles de favoriser la survie des RGCs ([45](#), [46](#)). L'urolithin a été administrée immédiatement après axotomie du nerf optique. Les animaux témoins ont reçu des injections intraoculaires de véhicule (NaCl 0,9% stérile dans du DMSO 1%) au moment de l'axotomie.

Immunohistochimie

Les animaux ont été anesthésiés et perfusés avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% une semaine après axotomie. Les yeux ont été immédiatement recueillis et la rétine soigneusement disséquée. Les rétines ont été incubées pendant une nuit à 4 °C dans une solution de blocage (NGS 10%, BSA 1% et Triton X-100 0,5% dans du PBS), suivie d'une incubation dans un anticorps primaire contre un marqueur spécifique des cellules ganglionnaires de la rétine, RBPMS ([47](#)) (0,01 μ g/ml, Phosphosolution) pendant 5 jours à 4 °C. Les rétines ont ensuite été lavées et incubées avec un anticorps secondaire anti-lapin IgG (0,01 μ g/ml, AlexaFluor594, Molecular Probes) pendant 4h à température ambiante. Pour finir, les échantillons ont été montés, recouverts d'une solution anti-décoloration (SlowFade, Molecular Probes) et visualisés à l'aide d'un microscope à fluorescence Zeiss Imager M2 avec Apotome 2.

Quantification du niveau de survie des cellules ganglionnaires de la rétine

Les échantillons ont été montés avec les fibres nerveuses orientées vers le haut et visualisés avec un microscope à fluorescence. Les neurones RBPMS positifs ont été comptés dans trois zones carrées localisées à 0,25, 0,625 et 1 mm du disque optique, pour un total de 12 régions rétiniennes. Les images ont été analysées avec le logiciel Image J (NIH).

Statistiques

Le logiciel Prism 7 (GraphPad) a été utilisé pour toutes les analyses statistiques. Les courbes des tests de paralysie et de durée de vie ont été comparées en utilisant le test Log-rank (Mantel-Cox). Pour les tests de neuro-dégénérescence un two-tailed t test a été réalisé. La quantification de la fluorescence a été analysée avec un test one-way ANOVA. L'analyse de la morphologie des mitochondries a été analysée avec un test two-way ANOVA. Pour finir, les données issues des rétines de souris ont été traitées à l'aide d'une analyse one-way ANOVA, suivie d'un Tukey's Multiple Comparison *post hoc* test.

Résultats

Les extraits de Pomme-grenade et leurs dérivés métaboliques réduisent la neuro-toxicité de FUS.

Afin d'étudier l'effet neuro-protecteur de deux polyphénols présents dans la pomme-grenade : la punicalagine (PU) et l'acide ellagique (EA) ; et de deux de leurs dérivés : l'urolithin A (UA) et l'urolithin B (UB) ; nous avons utilisé divers modèles *C. elegans* de maladies neuro-dégénératives. Pour commencer, nous nous sommes servis d'un modèle de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) exprimant dans ses neurones moteurs la protéine mutante FUS^(S57Δ). Nous avons précédemment publié (48) que ces vers transgéniques développaient une paralysie progressive ainsi qu'une dégénérescence de leurs motoneurones. Dans le cas présent, nous avons démontré que les 4 composés PU, EA, UA et UB étaient en mesure de diminuer la toxicité de FUS (Fig.1 A, B). En effet, en présence de chacun des composés les vers ont présenté moins de problèmes locomoteurs et de neuro-dégénérescence. Pour continuer, nombre d'études ont observé que la neuro-inflammation était une caractéristique importante de la SLA et d'autres maladies neuro-dégénératives (49, 50). Nous avons nous même publié (51) que dans nos modèles *C. elegans* de la SLA on observait une sur-activation du système immunitaire inné en réponse à l'expression des protéines mutantes TDP-43 et FUS. Afin de visualiser cette réponse immunitaire nous avons utilisé le reporter *nlp-29::GFP* qui encode une protéine antimicrobienne exprimée par le ver après une infection fongique ou une blessure physique (52). Comme précédemment, nous avons confirmé que les mutants FUS^(S57Δ) avaient un niveau d'expression de *nlp-29::GFP* significativement plus élevé que les animaux exprimant la protéine FUS^(WT). De plus, nous avons démontré que les composés PU, EA, UA et UB étaient en mesure de diminuer cette réponse immunitaire innée liée à l'expression de FUS^(S57Δ) (Fig. 1 C).

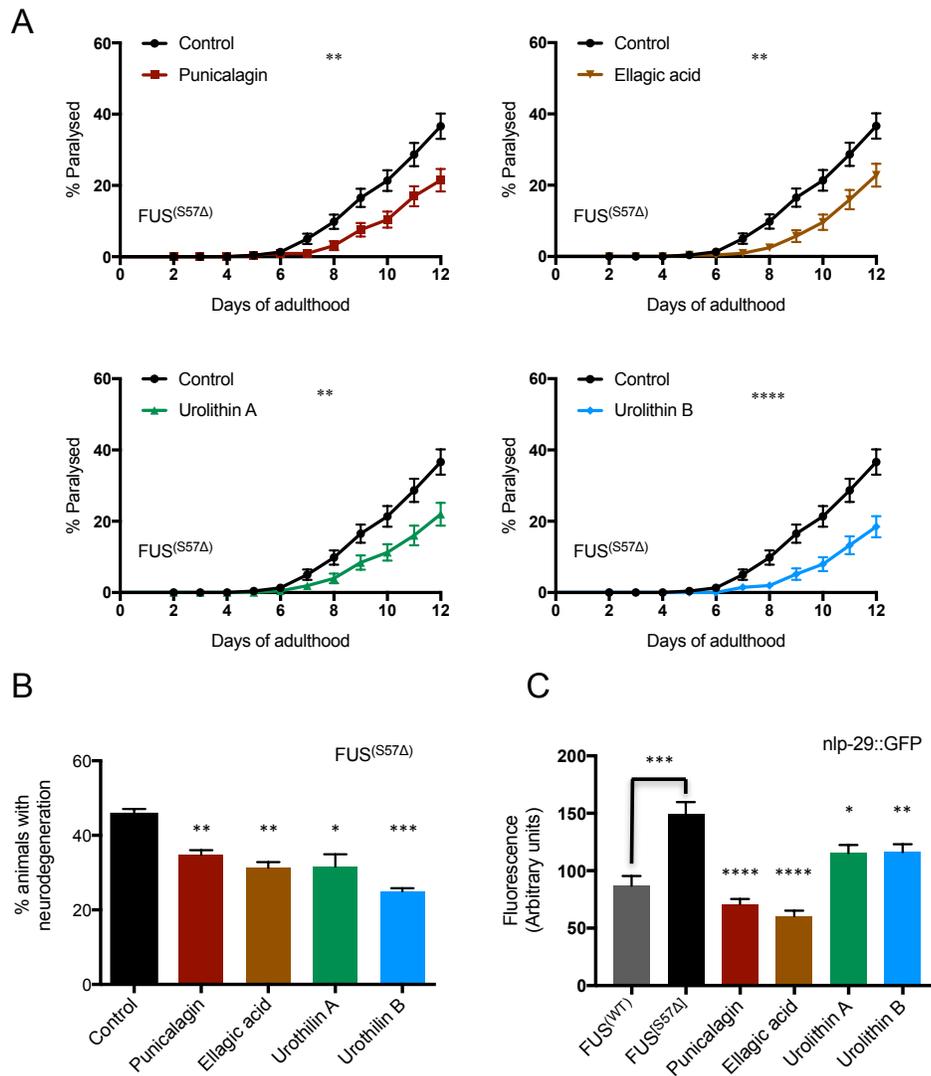


Figure 1. Les extraits de Pomme-grenade et leurs dérivés métaboliques réduisent la neuro-toxicité de FUS. (A) Punicalagine, acide ellagique, urolithin A et urolithin B ont réduit la paralysie liée à l'âge sur des vers mutants FUS. Test Log-rank (Mantel-Cox), ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$, ($n \approx 270$). (B) Quantification de la neuro-dégénérescence chez des vers FUS^(S57Δ) ayant 9 jours de vie adulte. La neuro-dégénérescence des motoneurones a été réduite par l'administration de punicalagine, acide ellagique, urolithin A et urolithin B. Two-tailed t-test, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, ($n = 100$). (C) Quantification de la fluorescence de *nlp-29::GFP* chez des vers FUS^(WT) et FUS^(S57Δ) ayant 2 jours de vie adulte. Punicalagine, acide ellagique, urolithin A et urolithin B ont réduit l'expression de *nlp-29::GFP* chez les vers mutants FUS. Test one-way ANOVA, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ($n = 200$). Les valeurs sont exprimées comme la moyenne \pm S.E.M.

Les extraits de Pomme-grenade et leurs dérivés réduisent la neuro-toxicité de HAR-1.

Le but des expériences suivantes était de déterminer si les effets bénéfiques des molécules issues de la pomme-grenade étaient spécifique au modèle FUS ou s'ils étaient répliquables sur d'autres modèles de la SLA. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles non transgéniques *har-1*. Le gène *har-1* étant chez *C. elegans* un orthologue du gène humain CHCHD10 impliqué dans la SLA ([53](#), [54](#)). En caractérisant deux souches mutantes *har-1*(gk3124) et *har-1*(ad2155) nous avons pu déterminer que celles-ci présentaient des niveaux de paralysie et de neuro-dégénérescence plus élevés que des vers non transgéniques Wild-type (données non publiées). Les molécules PU, EA, UA et UB ont été en mesure de réduire la neuro-toxicité de *har-1*(gk3124) (Fig. 2 A, C) mais seul UA a diminué significativement la paralysie dans le modèle *har-1*(ad2155) (Fig. 2 B). Chez l'humain, des mutations dans le gène CHCHD10 qui encode une protéine mitochondriale peuvent entraîner des dysfonctionnements au niveau des mitochondries et *in fine* la SLA ([55](#)). Chez *C. elegans* nous avons comparé la morphologie des mitochondries de vers Wild-type versus des vers *har-1*(gk3124) et *har-1*(ad2155). Nous avons ainsi pu constater que les mutants *har-1* avaient un pourcentage beaucoup plus élevé de mitochondries fragmentées et que l'urolithin A était en mesure de diminuer ce pourcentage (Fig. 2 D).

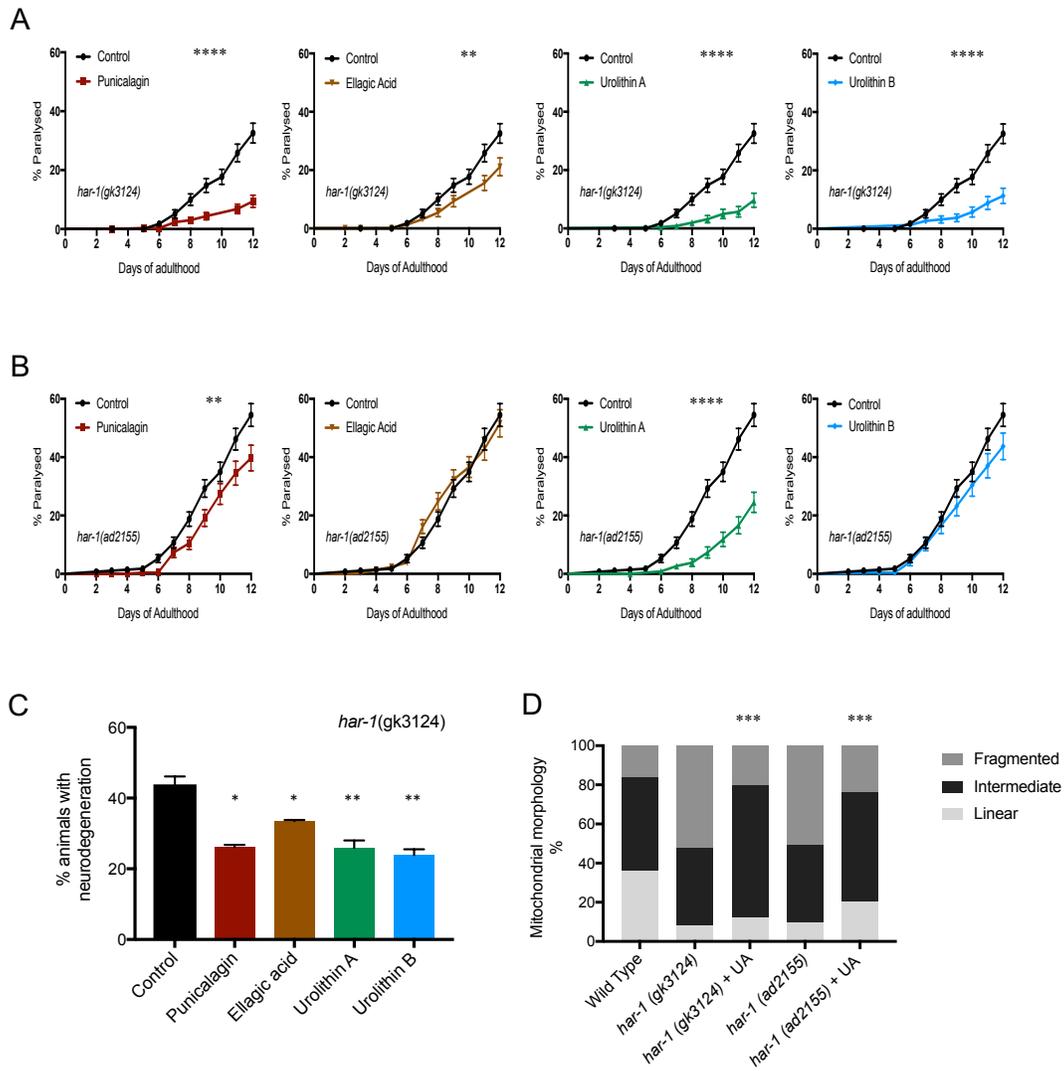


Figure 2. Les extraits de Pomme-grenade et leurs dérivés réduisent la neuro-toxicité de HAR-1. (A) Punicalagine, acide ellagique, urolithin A et urolithin B ont réduit la paralysie progressive induite par *har-1(gk3124)*. (B) L'urolithin A a réduit les problèmes de motilité des vers *har-1(ad2155)*. Test Log-rank (Mantel-Cox), ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$, ($n \approx 270$). (C) Quantification de la neuro-dégénérescence chez des vers *har-1(gk3124)* ayant 9 jours de vie adulte. La neuro-dégénérescence des motoneurones a été réduit par l'administration de punicalagine, acide ellagique, urolithin A et urolithin B. Two-tailed t-test, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, ($n = 100$). Les valeurs sont exprimées comme la moyenne \pm S.E.M. (D) Analyse qualitative de la morphologie des mitochondries de vers Wild-type versus des vers mutants *har-1(gk3124)* et *har-1(ad2155)* ayant 9 jours de vie adulte. L'urolithin A a réduit le pourcentage de mitochondries fragmentées chez les mutants *har-1*. Two-way ANOVA, *** $P < 0,001$, ($n = 100$).

Les extraits de Pomme-grenade et leurs dérivés métaboliques protègent contre la toxicité liée à une expansion de polyglutamine.

Après avoir démontré les effets neuro-protecteurs des polyphénols issus de la pomme-grenade et de leurs dérivés sur plusieurs modèles de la SLA, nous avons souhaité déterminer si ces molécules pouvaient également avoir un effet sur d'autres modèles de maladies neuro-dégénératives. Pour cela, nous avons utilisé des modèles de la maladie de Huntington. Cette maladie héréditaire se caractérise par une expansion de CAG dans l'intron 1 du gène huntingtine (17). Elle entraîne chez les personnes atteintes des symptômes variés qui comprennent généralement des troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques. Il existe plusieurs modèles *C. elegans* pour la maladie de Huntington chacun reproduisant divers aspects de la maladie. Dans la présente étude nous avons utilisé des vers transgéniques exprimant des répétitions plus ou moins longues de CAG soit dans les neurones, les muscles ou les intestins. Dans un premier temps, nous avons pu observer que EA, UA et UB étaient en mesure de diminuer significativement le pourcentage de paralysie et de neuro-dégénérescence chez des vers exprimant 67 répétitions de glutamines (Q) dans leurs neurones (Fig. 3 A, B). Pour continuer, nous avons mesuré les niveaux de fluorescence de vers 67Q et 19Q qui ont été croisés avec le reporter *nlp-29::GFP* car l'inflammation est également une caractéristique de la maladie de Huntington (56). Nous avons ainsi pu constater que les vers exprimant 67Q avaient une activation plus importante de leur système immunitaire innée comparé aux vers exprimant 19Q et que les composés EA, UA et UB étaient en mesure de réduire l'expression de *nlp-29::GFP* (Fig. 3 C). Pour finir, l'huntingtine mutée entraîne la formation d'agrégats qui seraient éventuellement toxiques. Nous nous sommes donc demandé si nos molécules d'intérêts avaient un effet sur ces agrégats. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles exprimant des répétitions de CAG soit dans les muscles soit dans l'intestin car la visualisation des agrégats y était plus simple que dans les neurones. Nous avons ainsi pu relever que EA, UA et UB n'avaient pas d'effet sur l'agrégation et qu'uniquement PU était en mesure de la diminuer (Fig. 4 A, B). En d'autres termes, EA, UA et UB ont des effets bénéfiques tout en n'influençant pas l'agrégation.

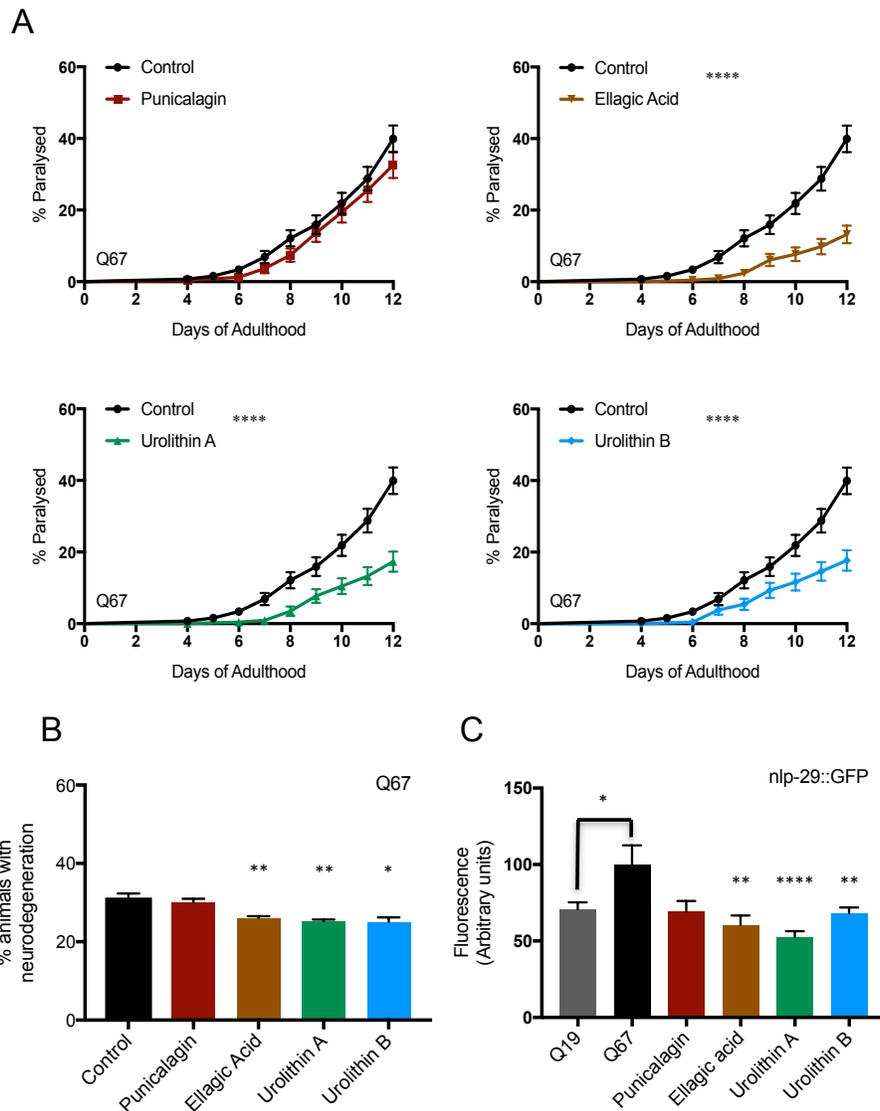


Figure 3. Les extraits de Pomme-grenade et leurs dérivés métaboliques protègent contre la toxicité des répétitions de polyQ. (A) L'acide ellagique, l'urolithin A et l'urolithin B ont réduit la paralysie liée à l'expression toxique de répétitions de CAG dans les neurones de vers transgéniques. Test Log-rank (Mantel-Cox), **** $P < 0,0001$, ($n \approx 270$). (B) Quantification de la neuro-dégénérescence chez des vers (67Q) ayant 9 jours de vie adulte. La neuro-dégénérescence des motoneurones a été réduite par l'administration d'acide ellagique, urolithin A et urolithin B. Two-tailed t-test, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, ($n = 100$). (C) Quantification de la fluorescence de *nlp-29::GFP* chez des vers (Q19) et (Q67) ayant 2 jours de vie adulte. L'acide ellagique, l'urolithin A et l'urolithin B ont réduit l'expression de *nlp-29::GFP* chez les vers transgéniques (Q67). Test one-way ANOVA, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$, ($n = 200$). Les valeurs sont exprimées comme la moyenne \pm S.E.M.

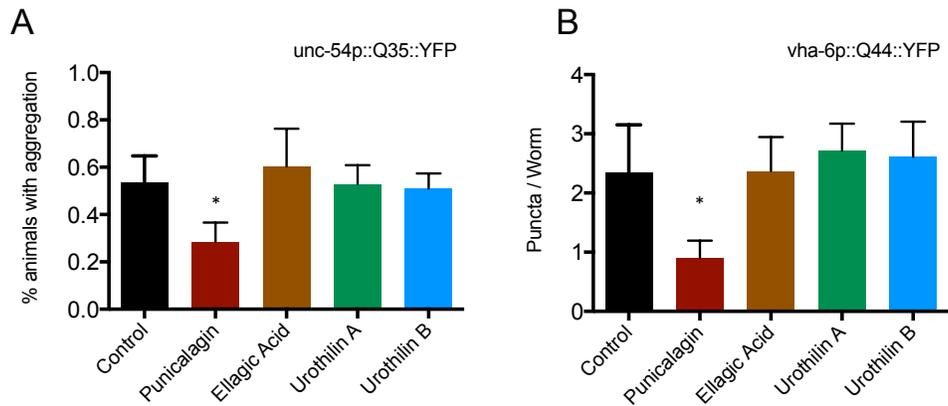


Figure 4. Les effets bénéfiques des extraits de Pomme-grenade et de leurs dérivés métaboliques ne dépendent pas de l'agrégation. (A) Quantification du nombre d'animaux ayant des agrégats de polyQ dans les muscles (n=100) après 2 jours de vie adulte. (B) Quantification par ver du nombre d'agrégats dans l'intestin (n=100) après 2 jours de vie adulte. Punicalagine est l'unique composé qui semble influencer l'agrégation. Les valeurs sont exprimées comme la moyenne \pm S.E.M (Two-tailed t-test, *P<0,05).

L'Urolithin A protège les cellules ganglionnaires de la rétine d'une mort induite par axotomie chez la souris.

Suite à l'observation des effets bénéfiques de PU, EA, UA et UB sur plusieurs modèles *C. elegans* de la SLA et de la maladie de Huntington, nous avons souhaité tester l'une de ces molécules sur un modèle animal plus proche de l'humain : la souris. Pour cela, nous avons choisi l'urolithin A car cette molécule a eu un effet neuro-protecteur sur tous les modèles *C. elegans* testés. De plus, L'UA présente une plus grande biodisponibilité que PU et EA et elle serait la seule molécule capable de traverser la barrière hémato-encéphalique ([57](#), [58](#)). Dans le but de confirmer l'effet de l'urolithin A sur la survie neuronale, une seule dose intra-vitréenne a été administrée sur des souris au moment de l'axotomie de leur nerf optique. Cette axotomie a induit la mort sélective des cellules ganglionnaires de la rétine (RGCs). Les rétines des yeux traités avec UA présentaient systématiquement des densités de RGCs plus élevées par rapport à celles traitées avec un véhicule (Fig. 5 A, C). En effet, l'analyse quantitative a montré qu'une semaine après la lésion du nerf optique, l'urolithin A permettait une survie substantielle des RGCs par rapport aux yeux traités avec le véhicule (urolithin A : 69% de survie, véhicule : 54% de survie) (Fig. 5 D). Ces données confirment que l'urolithin A exerce un puissant effet neuro-protecteur sur les neurones du système nerveux central endommagés.

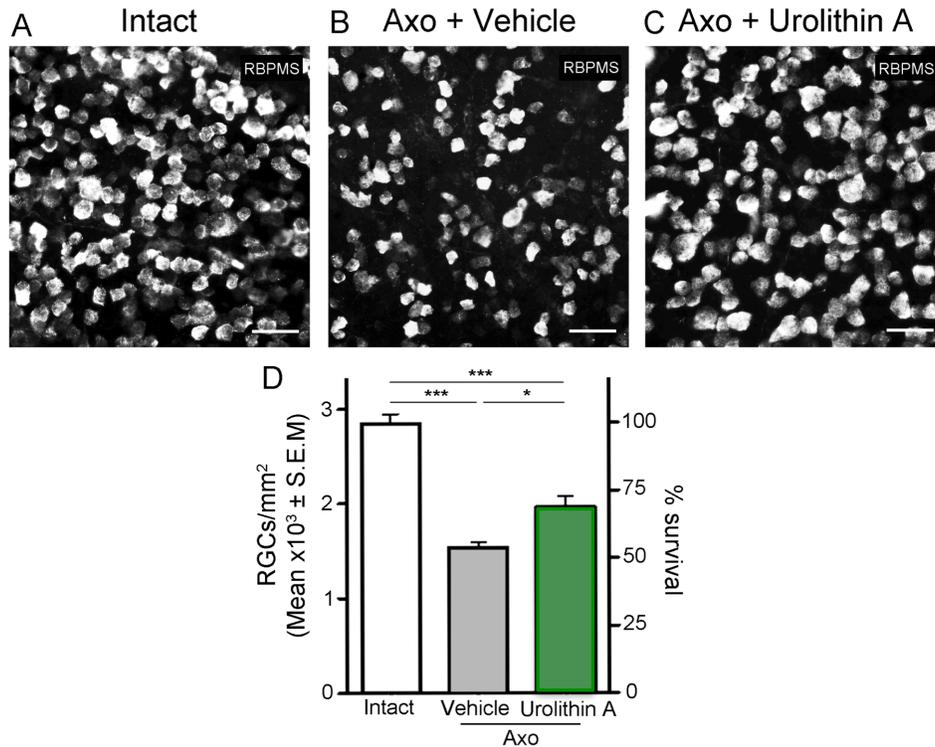


Figure 5. L'Urolithin A protège les cellules ganglionnaires de la rétine d'une mort induite par axotomie. (A-C) Une semaine après axotomie du nerf optique, les rétines montées entières traitées avec l'urolithin A présentent des densités plus élevées de RBPMS-positive RGCs comparées aux yeux témoins traités avec le véhicule. Barre d'échelle : 50 μ m. (D) L'analyse quantitative a confirmé que l'urolithin A (n=5) permettait une survie significative du soma des cellules ganglionnaires de la rétine par rapport aux yeux traités avec le véhicule (n=5). Les densités de soma chez les souris C57B1/6 intactes et non blessées sont indiquées à titre de référence (100% de survie, n = 4). Les valeurs sont exprimées comme la moyenne \pm S.E.M (ANOVA, *P<0,1, ***P<0,001).

Les extraits de Pomme-grenade et leurs dérivés augmentent légèrement la durée de vie.

Au-delà de leur effet neuro-protecteur, nous avons voulu déterminer si les molécules issues de la pomme-grenade ainsi que leurs dérivés étaient en mesure d'augmenter l'espérance de vie de nos modèles *C. elegans*. Pour ce qui est de l'espérance de vie moyenne du modèle FUS^(S57Δ), PU et UA ont été en mesure de l'augmenter de 15 à 17 jours. Et pour ce qui est de son espérance de vie maximale qui était initialement de 29 jours, PU l'a fait augmenter jusqu'à 41 jours et UA et UB jusqu'à 47 jours (Fig. 6 A). Le modèle *har-1(ad2155)* a pour sa part présenté une espérance de vie moyenne courte de 9 jours et une espérance de vie maximale de 25 jours. Les composés EA et UA ont pu augmenter l'espérance de vie moyenne des vers de 9 à 11 jours mais aucun composé n'a été en mesure d'augmenter l'espérance de vie maximale (Fig. 6 B). Enfin, le modèle transgénique Q67 de la maladie de Huntington a vu son espérance de vie moyenne et maximale augmenter en présence des composés EA, UA et UB (Fig. 6 C). Nos molécules d'intérêts ont donc un effet sur l'espérance de vie de nos modèles de maladies neuro-dégénératives mais cet effet varie grandement d'une molécule à une autre et d'un modèle à un autre.

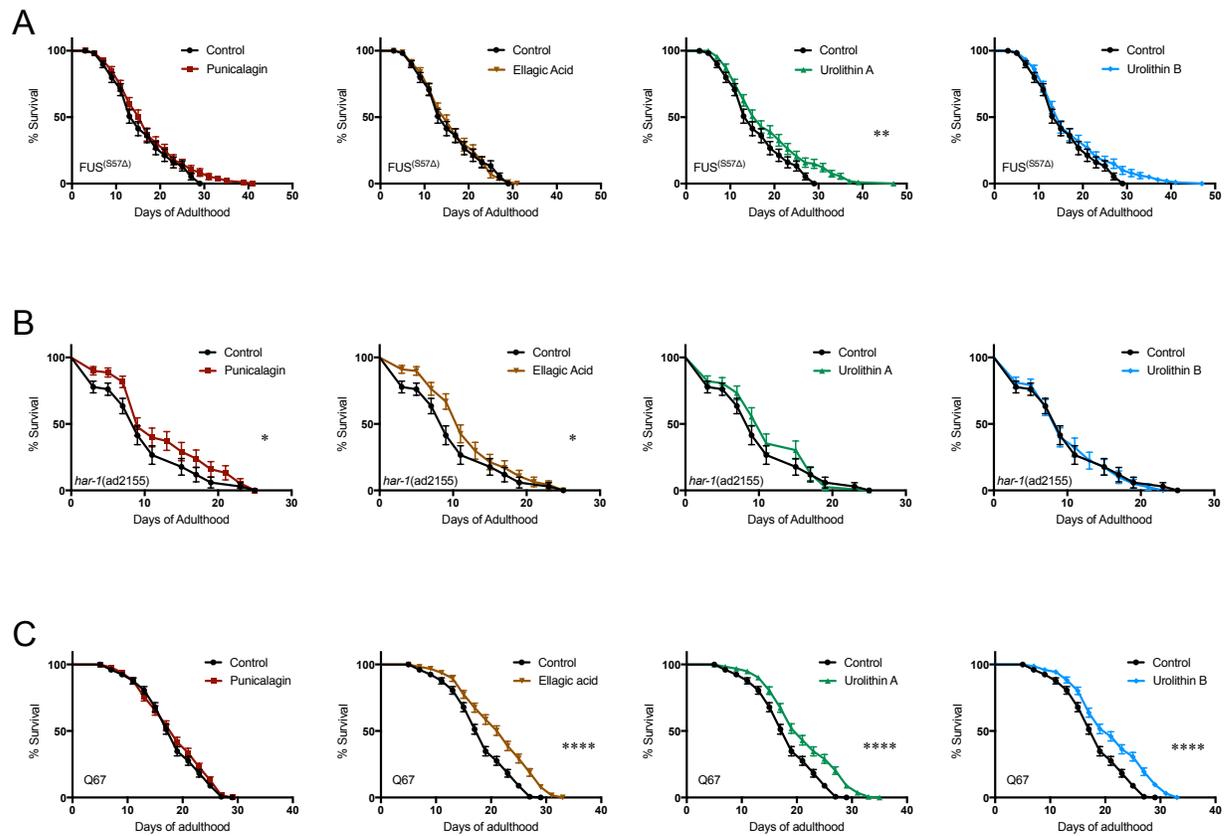


Figure 6. Les extraits de Pomme-grenade et leurs dérivés augmentent légèrement l'espérance de vie. (A-C) Effet de PU, EA, UA et UB sur la durée de vie des modèles FUS^(S57Δ), *har-1(ad2155)* et Q67. Test Log-rank (Mantel-Cox), *P<0,05, **P<0,01, ****P<0,0001, (n≈270).

L'effet bénéfique de l'Urolithin A est dépendant du processus de mitophagie.

Pour poursuivre notre étude, nous avons souhaité investiguer les mécanismes moléculaires au travers desquels nos composés d'intérêts promulguaient leurs effets bénéfiques. Depuis plusieurs années, l'autophagie est un mécanisme identifié comme étant une cible thérapeutique prometteuse dans le cadre de maladies neuro-dégénératives (59). Dans ce contexte, un certain nombre de molécules naturelles ont été identifiées comme étant capable de moduler l'autophagie (60, 61). Dans un premier temps, nous avons utilisé la technique du RNAi qui permet de knock-down l'expression d'un gène spécifique dans nos vers pour bloquer le mécanisme de l'autophagie. De cette façon nous avons pu constater que l'effet neuro-protecteur de PU, EA et UB n'était pas dépendant de ce mécanisme mais que celui de UA l'était (Fig. 7 A-D). Dans un deuxième temps, ayant observé qu'en présence d'urolithin A les mutants *har-1* avaient des mitochondries en meilleures santé (Fig. 7 D), nous avons voulu savoir si l'effet de UA était dépendant de la mitophagie. Pour se faire nous avons knock-down les gènes *dct-1* et *skn-1* et avons observé qu'effectivement en inhibant la mitophagie on inhibait l'effet bénéfique de UA (Fig. 7 E). L'urolithin A agit donc au travers de l'autophagie et plus précisément de la mitophagie ce qui n'est pas le cas des autres composés.

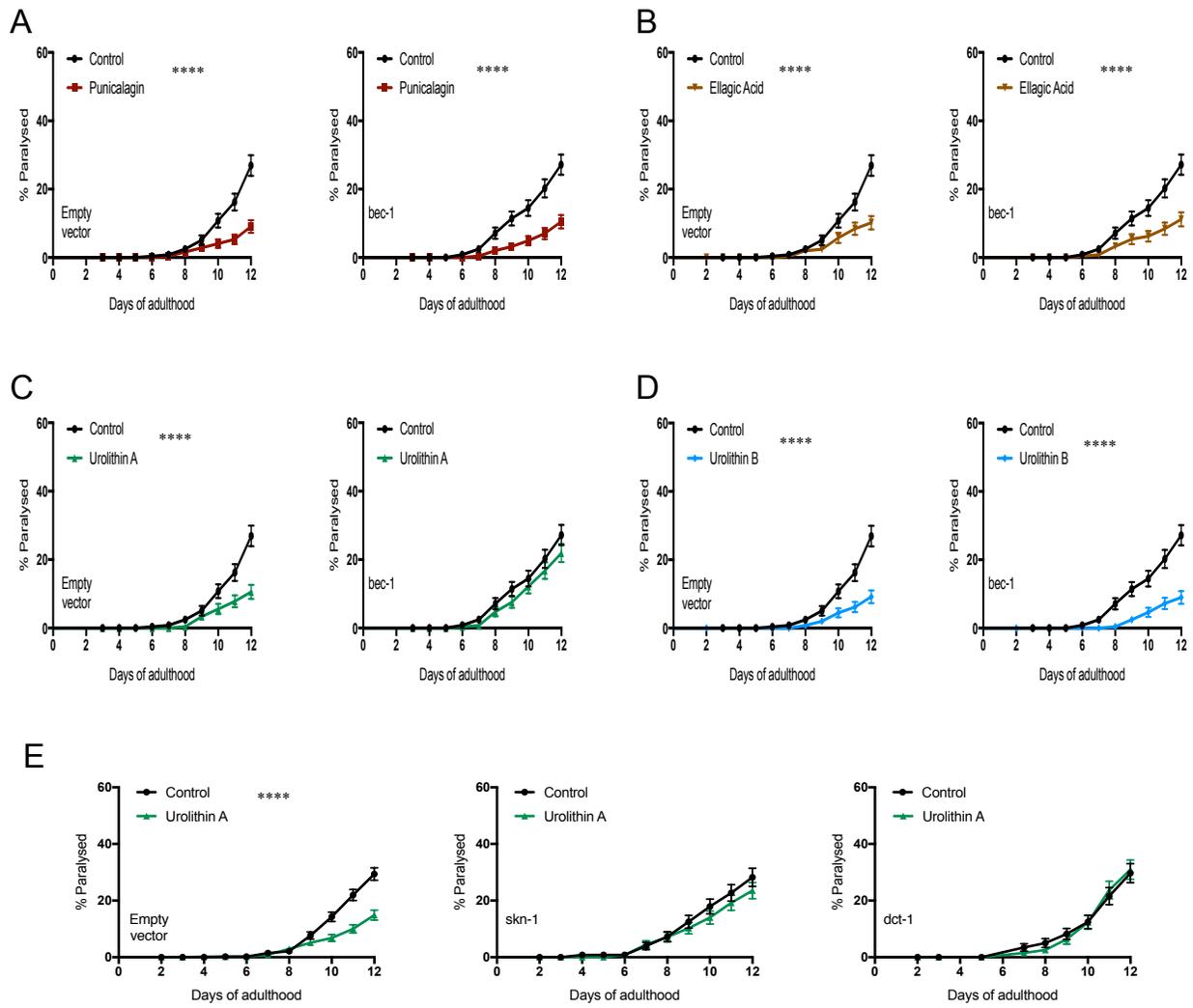


Figure 7. L'effet bénéfique de l'Urolithin A est dépendant du processus de mitophagie.

(A-D) Niveau de paralysie de vers *FUS*^(S57Δ) qui ont été nourris avec un RNAi empty vector ou *bec-1* et traités avec punicalagine, acide ellagique, urolithin A et urolithin B. Seul l'urolithin A n'a plus d'effet positif sur la paralysie lorsque les vers transgéniques sont nourris avec le RNAi *bec-1*. (E) Niveau de paralysie des mutants *FUS* qui ont été nourris avec un RNAi empty vector, *dct-1* ou *skn-1* et traités avec l'urolithin A. Lorsque l'expression de *dct-1* ou *skn-1* est knock-down, l'urolithin A ne produit plus d'effet bénéfique sur la paralysie. Test Log-rank (Mantel-Cox), ****P<0,0001, (n≈270). Les valeurs sont exprimées comme la moyenne ± S.E.M.

Les extraits de Pomme-grenade et leurs dérivés n'ont pas d'effets sur les voies de résistance au stress chez *C. elegans*.

Une hypothèse que nous avons posée était que les extraits de pomme-grenade et leurs dérivés métaboliques activaient une des voies de résistance au stress chez *C. elegans*. Ces voies ont été extrêmement bien conservées au cours de l'évolution et leur activation peut promouvoir la survie cellulaire et donc la survie neuronale (62). Parmi ces voies il y a celles qui réagissent au stress thermique, stress mitochondrial, stress oxydatif et au stress du réticulum endoplasmique. Afin de déterminer si nos molécules d'intérêts activaient une de ces voies, nous avons utilisé des souches exprimant des reporters GFP et avons quantifié la fluorescence. Nous avons ainsi observé que PU, EA, UA et UB n'avaient aucune influence sur les niveaux de fluorescence (Fig. 8 A-D) et donc que leur effet neuro-protecteur était indépendant de ces voies de résistance au stress.

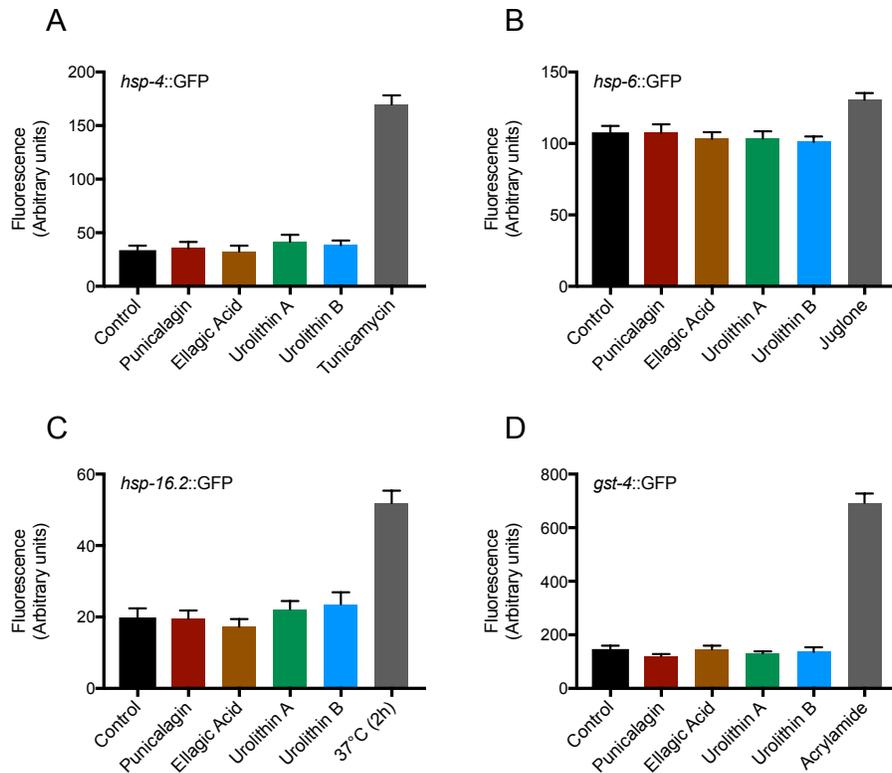


Figure 8. Les extraits de Pomme-grenade et leurs dérivés n'ont pas d'effets sur les voies de résistance au stress chez *C. elegans*. En quantifiant la fluorescence de *hsp-4::GFP*, *hsp-6::GFP*, *hsp-16.2::GFP* et *gst-4::GFP* chez des vers ayant 2 jours de vie adulte, il a été déterminé qu'aucun composé n'a d'effet sur : le stress lié au réticulum endoplasmique (A), le stress mitochondrial (B), le heat shock stress (C) et le stress oxydatif (D). Les valeurs sont exprimées comme la moyenne \pm S.E.M, ANOVA, (n=200).

Discussion

Le traitement de modèles in-vivo par des polyphénols et leurs dérivés métaboliques prévient partiellement l'apparition de phénotypes neuro-dégénératifs.

Pour la réalisation de cette étude, nous avons souhaité procéder de la manière suivante : utiliser exclusivement des modèles in-vivo et non des modèles in-vitro, réaliser les expériences sur différents modèles de maladies neuro-dégénératives, et enfin, confirmer chez la souris les résultats obtenus chez le *C. elegans*. C'est cette approche, qui selon nous, fait toute la force de notre étude.

C'est à la suite d'un screen réaliser avec divers composés d'origine naturelle allant de l'extrait de curcuma au sirop d'érable que nous avons identifié la punicalagine, l'acide ellagique, l'urolithin A et l'urolithin B. En effet, ces composés issus de la pomme-grenade présentaient des résultats prometteurs et une recherche bibliographique n'a fait que confirmer notre intérêt. De nombreuses études avaient déjà mis en lumière l'effet de la pomme-grenade, de son jus et de ses polyphénols dans le cadre du cancer de la prostate et d'autres pathologies ([63](#), [64](#)). Mais pratiquement aucune n'avait étudié l'effet de PU et EA sur le système nerveux central et les pathologies qui y sont associées ([65](#), [66](#)). Et encore moins se sont intéressées à leurs dérivés métaboliques UA et UB qui pourtant d'après un consensus grandissant seraient à l'origine de l'effet bénéfique de la pomme-grenade ([57](#)).

Nos résultats ont clairement démontré un effet neuro-protecteur de PU, EA, UA et UB avec une diminution des défauts de motilité et de la neuro-dégénérescence chez des modèles de la sclérose latérale amyotrophique et de la maladie de Huntington. Ils ont ensuite, chez la souris, confirmé le fort potentiel de l'urolithin A. D'ailleurs, la capacité de UA à promouvoir la survie neuronale chez la souris est très intéressante. UA a été administrée juste après la lésion du nerf optique, il n'y a donc eu aucun traitement préventif, ce qui n'était pas le cas chez *C. elegans* où le contact avec la molécule était permanent soit avant même l'apparition

des symptômes moteurs. Ensuite, ces résultats ont montré que UA pouvait avoir un effet bénéfique sur un autre type de population neuronale que celui étudié chez *C. elegans*. Et enfin, les souris étant des mammifères cela encourage grandement l'utilisation thérapeutique de UA chez l'humain.

Concernant les expériences chez *C. elegans*, elles ont été réalisées avec une concentration finale de 20µM. Néanmoins, nous avons effectué un test de paralysie avec une concentration finale de 50µM pour déterminer si l'effet de nos composés pouvait dépendre de leur dose. Nous avons ainsi constaté qu'à 50µM l'effet de PU et EA devenait toxique et que celui de UA et UB ne changeait pas (**annexe 3**). Il semblerait donc que l'effet de PU et EA soit dose-dépendant et que celui de UA et UB ne le soit pas. Toutefois, pour confirmer cela il faudrait tester une plus grande échelle de concentrations. Un autre avantage serait de pouvoir encore diminuer leur concentration. Par ailleurs, il serait intéressant de tester les molécules en combinaison et déterminer si associées ensemble elles sont en mesure d'avoir un effet synergique. En effet chaque molécule n'a pas forcément le même mécanisme d'action et ne cible pas les mêmes voies cellulaires. Il aurait également été intéressant de tester directement le jus de pomme-grenade. Celui-ci contient entre autres PU et EA toutefois nos vers *C. elegans* n'auraient ensuite pas pu les métaboliser en UA et UB car ils ne possèdent pas le microbiote adéquat. Enfin, comme il l'a été mentionné, les modèles *C. elegans* de maladies neuro-dégénératives ont subi un traitement préventif. Il serait donc pertinent d'exposer les vers qu'à partir du moment où les symptômes apparaissent c'est-à-dire autour du 7^{ème} jour de vie adulte et observer si les composés sont en mesure de modifier l'évolution de la maladie en plus de la prévenir en partie.

Parallèlement, il est à noter que le faible niveau de neuro-dégénérescence dans le modèle Q67 (30%) s'explique très certainement par le fait que le test a été réalisé à l'aide d'un marqueur fluorescent spécifique aux motoneurones GABAergiques. Or il se trouve que l'expression transgénique de Q67 se fait de façon pan-neuronale et que c'est peut-être les neurones moteurs cholinergiques qui dégénéraient et causaient les problèmes moteurs dans le cas présent. Même si les composés ont été en mesure de diminuer la dégénérescence déjà faible des motoneurones GABAergiques, il faudrait confirmer ce résultat à l'aide d'un marqueur fluorescent spécifique aux motoneurones cholinergiques.

Pour résumer,

- PU a un effet neuro-protecteur sur les modèles SLA : FUS^(S57Δ), *har-1(gk3124)* et *har-1(ad2155)*. PU n'a pas d'effet sur les modèles HD sauf celui de diminuer la quantité d'agrégats.
- EA a un effet neuro-protecteur sur les modèles SLA : FUS^(S57Δ) et *har-1(gk3124)* mais pas sur le modèle *har-1(ad2155)*. EA a un effet positif sur le modèle HD Q67::YFP avec aucun effet sur la quantité d'agrégats dans les modèles Q35::YFP et Q44::YFP.
- UA a un effet neuro-protecteur sur tous les modèles *C. elegans* de SLA et HD ainsi que sur les cellules ganglionnaires de souris ayant subies une axotomie du nerf optique.
- UB a un effet neuro-protecteur sur les modèles SLA : FUS^(S57Δ) et *har-1(gk3124)* mais pas sur le modèle *har-1(ad2155)*. UB a un effet positif sur le modèle HD Q67::YFP avec aucun effet sur la quantité d'agrégats dans les modèles Q35::YFP et Q44::YFP.

Ces résultats démontrent que l'effet neuro-protecteur de PU, EA, UA et UB n'est pas spécifique à un modèle de maladie ou à une sous population de neurones. Pour finir, ils sont transposables d'un modèle animal simple à un modèle plus complexe.

Les mécanismes moléculaires subjacents

Démontrer l'effet bénéfique d'un composé n'est pas une fin en soi, encore faut-il déterminer qu'elle est son mécanisme d'action et qu'elles sont les voies moléculaires impliquées. Pour cela, nous avons pu profiter des nombreux avantages que présente le modèle *C. elegans*. En effet, il est simple d'y faire des modifications génétiques et son corps est transparent. Il existe donc de très nombreuses souches exprimant des reporters GFP qui permettent de visualiser et quantifier l'activation de voies moléculaires.

Pour commencer, nous nous sommes intéressés à la neuro-inflammation qui est un mécanisme pathologique récurrent dans les maladies neuro-dégénératives. De nombreuses études ont mis en lumière le pouvoir anti-inflammatoire des polyphénols (67). Parmi celles-ci,

certaines se sont intéressées au jus de pomme-grenade et à ses composés, en particulier dans le cadre de la maladie de Crohn, du diabète de type 2, de maladies cardiovasculaires ou encore de l'arthrite rhumatoïde (68-70). En ce qui nous concerne, des études ont démontré un effet de PU, EA, UA et UB sur la neuro-inflammation notamment sur des modèles de la maladie d'Alzheimer (71-73). Et il ressort globalement que l'effet anti-inflammatoire se ferait via l'inhibition de la voie NF- κ B. En réalisant nos expériences, nous avons pu confirmer cet effet anti-inflammatoire de PU, EA, UA et UB et cela dans un contexte inédit qui était celui de la SLA et de la maladie de Huntington. Toutefois, *C. elegans* n'ayant pas d'orthologue de NF- κ B nous n'avons pu confirmer que nos molécules d'intérêt inhibaient cette voie. Nos résultats associés à ceux des études précédentes renforcent les preuves que la pomme-grenade et les composés qui en dérivent sont des anti-inflammatoires universels et pourraient donc être utilisés dans le traitement de bon nombre de pathologies. D'ailleurs des essais cliniques ont déjà eu des résultats encourageants chez des patients (68, 69, 74).

Pour continuer, les maladies neuro-dégénératives s'accompagnent très souvent d'une accumulation de protéines oxydées et agrégées. Les raisons moléculaires derrière ce constat ne sont pas complètement élucidées. Toutefois, l'insuffisance du contrôle qualité des protéines jouerait un rôle important dans cette accumulation. Dans ce contexte, les polyphénols pharmacologiquement actifs et leurs dérivés présenteraient un fort potentiel préventif et thérapeutique contre l'agrégation au cours de la neuro-dégénérescence (61). Parmi nos résultats, nous avons pu constater que seul PU faisait diminuer l'agrégation de polyQ dans deux modèles Huntington. Hors, il est également le seul composé à ne pas diminuer la neuro-dégénérescence et la paralysie. Dans ce cas-ci la diminution de l'accumulation de protéines toxiques n'est donc pas synonyme de neuro-protection. Ces résultats alimentent le débat sur si oui ou non les agrégats de polyQ participent négativement à la pathologie de Huntington et sur si oui ou non ces agrégats devraient être une cible thérapeutique.

Dans le contrôle qualité des protéines, l'autophagie joue un rôle central et l'augmentation de son flux pourrait être un des mécanismes par lequel nos molécules d'intérêts agissent. En utilisant la technique du RNAi nous avons constaté que seul UA était dépendant de l'autophagie. Ce qui signifie que l'effet anti-agrégatif de PU ne se faisait pas au travers de l'autophagie. D'autre part, une étude a mis en évidence que UA a un effet protecteur

en augmentant la mitophagie c'est-à-dire en stimulant la dégradation des mitochondries endommagées ce qui *in fine* stimule la production de nouvelles mitochondries (75). Toujours en utilisant le RNAi nous avons confirmé que l'effet protecteur de UA dépend effectivement de la mitophagie. De plus, UA a été le seul à diminuer la paralysie et à améliorer la morphologie des mitochondries du modèle *har-1(ad2155)*. Cette propriété de UA est très prometteuse car les neurones sont très dépendants des mitochondries et de nombreuses maladies neuro-dégénératives sont associées à des dysfonctionnements mitochondriaux.

Les cellules possèdent des mécanismes de réponse aux stress dont les origines sont très diverses. Il y a le stress thermique, le stress oxydatif et le stress du réticulum endoplasmique pour ne citer qu'eux. Ces voies moléculaires peuvent promouvoir la survie cellulaire ou au contraire déclencher la mort par apoptose. Depuis de nombreuses années, le constat a été fait que le résultat de l'activation d'une de ces voies était dose-dépendant. En d'autres termes, une faible activation de ces voies aura un effet bénéfique sur la survie cellulaire alors qu'une forte activation aura tout l'effet contraire (76). Il y a donc un intérêt thérapeutique à diminuer le stress cellulaire ou alors à activer de façon modérée et bénéfique l'une des voies moléculaires de résistance au stress. Le stress du réticulum endoplasmique et le stress oxydatif sont des caractéristiques des maladies neuro-dégénératives (77, 78). Nous avons nous même publié qu'il était possible de réduire la toxicité neuronale de TDP-43 en diminuant le stress du réticulum endoplasmique à l'aide de molécules pharmacologiques (79). Présentement, après avoir mesuré le niveau d'activation de ces voies moléculaires en présence de PU, EA, UA et UB nous avons fait le constat qu'aucun des composés n'influençaient le niveau d'expression de nos reporters GFP. Nous en avons conclu que nos molécules d'intérêts n'interagissaient pas avec ces voies moléculaires.

Pour finir, il est intéressant de noter que les molécules utilisées dans la présente étude ne semblent pas avoir les mêmes mécanismes d'action que le Riluzole et l'Édaravone. Ce sont les deux seuls médicaments autorisés pour la SLA et ils ne prolongent la vie des patients que de quelques mois. En effet, le Riluzole diminue l'excitotoxicité liée au glutamate en diminuant sa libération au niveau des synapses et l'Édaravone est un antioxydant qui diminue le stress-oxydatif. Les effets du Riluzole et de l'Édaravone chez des modèles de souris de la SLA sont

très bien documentés et il serait intéressant de pouvoir tester PU, EA, UA et UB dans les mêmes conditions et comparer les résultats.

Potentiel thérapeutique des urolithins

Même en prenant en compte les nombreuses études qui associent la punicalagine et l'acide ellagique à des effets pertinents sur la santé. Le fait est qu'ils ont une faible biodisponibilité et sont métabolisés en urolithins par le microbiote intestinal (80). Les urolithins sont donc un parfait exemple d'interaction entre polyphénols alimentaires et microbiote pouvant affecter la santé humaine. Si la famille des urolithins comprend l'urolithin A, B, C et D ainsi que de nombreux dérivés méthylés ou conjugués c'est principalement UA et UB qui ont montré le plus de résultats encourageants. L'urolithin A est même à ce jour en essai clinique de phase 2 comme médicament anti-âge pour des patients âgés. Un essai précédent de phase 1A/1B avait démontré que la prise orale de UA ne présentait aucune toxicité. L'essai en cours cherche à confirmer chez l'humain la capacité de UA à améliorer les fonctions musculaires déclinantes avec l'âge via sa capacité à stimuler la mitophagie (75). Par ailleurs, même si les urolithins sont biodisponibles dans la circulation sanguine encore faut-il qu'elles puissent se rendre jusqu'au système nerveux central. Et d'après une étude computationnelle, seul UA serait en mesure de traverser la barrière hémato-encéphalique (57). Il faudrait évidemment confirmer cela in vivo chez des rats ou des souris. Les urolithins offrent ainsi une explication à l'effet bénéfique de la consommation de Pomme-grenade. Elles encouragent une approche préventive nutritionnelle des maladies neuro-dégénératives via la consommation régulière de polyphénols. De plus, l'urolithin A semble être une option pharmacologique viable aux traitements de maladies du système nerveux.

Conclusion et perspectives

Un certain nombre d'études épidémiologiques avaient mis en lumière l'impact de la consommation de polyphénols sur le développement de maladies neuro-dégénératives. Il semblerait maintenant que cet impact dépend en grande partie du microbiote intestinal et de sa capacité à métaboliser les polyphénols. Les grandes différences interindividuelles dans la composition du microbiote pourraient expliquer les effets bénéfiques variables observés lors d'une consommation importante de polyphénols. La présente étude renforce l'hypothèse que l'utilisation pharmacologique des urolithins et plus particulièrement de l'urolithin A et B dans le cadre de maladies neuro-dégénératives serait bénéfique. En effet, leur biodisponibilité, leurs effets neuro-protecteur et anti-inflammatoire, la capacité de UA à traverser la barrière hémato-encéphalique et sa non-toxicité démontrée par un essai clinique de phase 1A/1B vont dans ce sens. D'un point de vue nutritionnel, les résultats encouragent la consommation régulière de polyphénols même si les preuves ont encore besoin d'être approfondies chez l'humain. La Pomme-grenade est la principale source de punicalagine mais on en retrouve également dans les noix et les baies. Pour finir, les aliments miracles n'existent pas mais certains ont des propriétés fonctionnelles qui accompagnées d'un mode de vie sain pourraient impacter positivement la santé humaine dans son ensemble.

Bibliographie

Reference

1. Doble A. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology*. 1996;47(6 Suppl 4):S233-41.
2. Cho H, Shukla S. Role of Edaravone as a Treatment Option for Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020;14(1).
3. Hardiman O, van den Berg LH, Kiernan MC. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(11):639-49.
4. Kent-Braun JA, Walker CH, Weiner MW, Miller RG. Functional significance of upper and lower motor neuron impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 1998;21(6):762-8.
5. Chio A, Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E, et al. Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009;10(5-6):310-23.
6. Couratier P, Marin B, Lautrette G, Nicol M, Preux PM. [Epidemiology, clinical spectrum of ALS and differential diagnoses]. *Presse Med*. 2014;43(5):538-48.
7. Burrell JR, Vucic S, Kiernan MC. Isolated bulbar phenotype of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2011;12(4):283-9.
8. Eisen A, Kim S, Pant B. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a phylogenetic disease of the corticomotoneuron? *Muscle Nerve*. 1992;15(2):219-24.
9. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993;362(6415):59-62.
10. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, NY)*. 2006;314(5796):130-3.
11. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011;72(2):245-56.
12. Boylan K. Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Clin*. 2015;33(4):807-30.

13. Vande Velde C, Dion PA, Rouleau GA. Amyotrophic lateral sclerosis: new genes, new models, and new mechanisms. *F1000 Biol Rep*. 2011;3:18.
14. Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol*. 2010;9(10):995-1007.
15. Burberry A, Suzuki N, Wang JY, Moccia R, Mordes DA, Stewart MH, et al. Loss-of-function mutations in the C9ORF72 mouse ortholog cause fatal autoimmune disease. *Sci Transl Med*. 2016;8(347):347ra93.
16. Ling SC, Albuquerque CP, Han JS, Lagier-Tourenne C, Tokunaga S, Zhou H, et al. ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(30):13318-23.
17. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*. 1993;72(6):971-83.
18. Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP, Jr. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1985;44(6):559-77.
19. Williamson G. The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutr Bull*. 2017;42(3):226-35.
20. Cassidy A, Rogers G, Peterson JJ, Dwyer JT, Lin H, Jacques PF. Higher dietary anthocyanin and flavonol intakes are associated with anti-inflammatory effects in a population of US adults. *Am J Clin Nutr*. 2015;102(1):172-81.
21. Carter P, Gray LJ, Troughton J, Khunti K, Davies MJ. Fruit and vegetable intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2010;341:c4229.
22. van't Veer P, Jansen MC, Klerk M, Kok FJ. Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public Health Nutr*. 2000;3(1):103-7.
23. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998;56(11):317-33.
24. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000;55(6):481-504.

25. Serra-Majem L, Roman-Vinas B, Sanchez-Villegas A, Guasch-Ferre M, Corella D, La Vecchia C. Benefits of the Mediterranean diet: Epidemiological and molecular aspects. *Mol Aspects Med.* 2019;67:1-55.
26. Scarmeas N, Stern Y, Tang MX, Mayeux R, Luchsinger JA. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2006;59(6):912-21.
27. Hussain G, Zhang L, Rasul A, Anwar H, Sohail MU, Razzaq A, et al. Role of Plant-Derived Flavonoids and Their Mechanism in Attenuation of Alzheimer's and Parkinson's Diseases: An Update of Recent Data. *Molecules.* 2018;23(4).
28. Scarmeas N, Luchsinger JA, Mayeux R, Stern Y. Mediterranean diet and Alzheimer disease mortality. *Neurology.* 2007;69(11):1084-93.
29. Martinez-Lapiscina EH, Clavero P, Toledo E, Estruch R, Salas-Salvado J, San Julian B, et al. Mediterranean diet improves cognition: the PREDIMED-NAVARRA randomised trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84(12):1318-25.
30. Poddar J, Pradhan M, Ganguly G, Chakrabarti S. Biochemical deficits and cognitive decline in brain aging: Intervention by dietary supplements. *J Chem Neuroanat.* 2018.
31. Rabassa M, Zamora-Ros R, Palau-Rodriguez M, Tulipani S, Minarro A, Bandinelli S, et al. Habitual Nut Exposure, Assessed by Dietary and Multiple Urinary Metabolomic Markers, and Cognitive Decline in Older Adults: The InCHIANTI Study. *Mol Nutr Food Res.* 2020;64(2):e1900532.
32. Rabassa M, Cherubini A, Zamora-Ros R, Urpi-Sarda M, Bandinelli S, Ferrucci L, et al. Low Levels of a Urinary Biomarker of Dietary Polyphenol Are Associated with Substantial Cognitive Decline over a 3-Year Period in Older Adults: The Invecchiare in Chianti Study. *J Am Geriatr Soc.* 2015;63(5):938-46.
33. Miller MG, Hamilton DA, Joseph JA, Shukitt-Hale B. Dietary blueberry improves cognition among older adults in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Nutr.* 2018;57(3):1169-80.
34. Bowtell JL, Aboo-Bakkar Z, Conway ME, Adlam AR, Fulford J. Enhanced task-related brain activation and resting perfusion in healthy older adults after chronic blueberry supplementation. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2017;42(7):773-9.

35. DeKosky ST, Williamson JD, Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Ives DG, Saxton JA, et al. Ginkgo biloba for prevention of dementia: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2008;300(19):2253-62.
36. Shakibaei F, Radmanesh M, Salari E, Mahaki B. Ginkgo biloba in the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. A randomized, placebo-controlled, trial. *Complement Ther Clin Pract*. 2015;21(2):61-7.
37. Oskouei DS, Rikhtegar R, Hashemilar M, Sadeghi-Bazargani H, Sharifi-Bonab M, Sadeghi-Hokmabadi E, et al. The effect of Ginkgo biloba on functional outcome of patients with acute ischemic stroke: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2013;22(8):e557-63.
38. Bensalem J, Dudonne S, Etchamendy N, Pellay H, Amadieu C, Gaudout D, et al. Polyphenols From Grape and Blueberry Improve Episodic Memory in Healthy Elderly with Lower Level of Memory Performance: A Bicentric Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2019;74(7):996-1007.
39. Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev*. 2010;64(2):328-63.
40. Figueira I, Garcia G, Pimpao RC, Terrasso AP, Costa I, Almeida AF, et al. Polyphenols journey through blood-brain barrier towards neuronal protection. *Sci Rep*. 2017;7(1):11456.
41. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*. 2006:1-11.
42. Sarasija S, Norman KR. A gamma-Secretase Independent Role for Presenilin in Calcium Homeostasis Impacts Mitochondrial Function and Morphology in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2015;201(4):1453-66.
43. Sarasija S, Norman KR. Analysis of Mitochondrial Structure in the Body Wall Muscle of *Caenorhabditis elegans*. *Bio Protoc*. 2018;8(7).
44. Lebrun-Julien F, Morquette B, Douillette A, Saragovi HU, Di Polo A. Inhibition of p75(NTR) in glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci*. 2009;40(4):410-20.
45. Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(5):1632-6.

46. Leon JA, Leon CS, Aron-Rosa D, Bremond-Gignac D, Lassau JP. Endoscopic technique for suturing posterior chamber intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg.* 2000;26(5):644-9.
47. Rodriguez AR, de Sevilla Muller LP, Brecha NC. The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina. *J Comp Neurol.* 2014;522(6):1411-43.
48. Vaccaro A, Tauffenberger A, Aggad D, Rouleau G, Drapeau P, Parker JA. Mutant TDP-43 and FUS cause age-dependent paralysis and neurodegeneration in *C. elegans*. *PLoS One.* 2012;7(2):e31321.
49. Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, et al. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine.* 2016;1(1).
50. McCauley ME, Baloh RH. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathol.* 2018.
51. Veriepe J, Fossouo L, Parker JA. Neurodegeneration in *C. elegans* models of ALS requires TIR-1/Sarm1 immune pathway activation in neurons. *Nat Commun.* 2015;6:7319.
52. Pujol N, Cypowyj S, Ziegler K, Millet A, Astrain A, Goncharov A, et al. Distinct innate immune responses to infection and wounding in the *C. elegans* epidermis. *Curr Biol.* 2008;18(7):481-9.
53. Muller K, Andersen PM, Hubers A, Marroquin N, Volk AE, Danzer KM, et al. Two novel mutations in conserved codons indicate that CHCHD10 is a gene associated with motor neuron disease. *Brain.* 2014;137(Pt 12):e309.
54. Woo JA, Liu T, Trotter C, Fang CC, De Narvaez E, LePochat P, et al. Loss of function CHCHD10 mutations in cytoplasmic TDP-43 accumulation and synaptic integrity. *Nat Commun.* 2017;8:15558.
55. Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chaussenot A, Genin EC, Lacas-Gervais S, Fragaki K, et al. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain.* 2014;137(Pt 8):2329-45.
56. Silvestroni A, Faull RL, Strand AD, Moller T. Distinct neuroinflammatory profile in post-mortem human Huntington's disease. *Neuroreport.* 2009;20(12):1098-103.

57. Yuan T, Ma H, Liu W, Niesen DB, Shah N, Crews R, et al. Pomegranate's Neuroprotective Effects against Alzheimer's Disease Are Mediated by Urolithins, Its Ellagitannin-Gut Microbial Derived Metabolites. *ACS Chem Neurosci*. 2016;7(1):26-33.
58. Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D. Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *J Nutr*. 2006;136(10):2481-5.
59. Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, Bento CF, Andrews SP, Ashkenazi A, et al. Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron*. 2017;93(5):1015-34.
60. Huang Z, Adachi H. Natural Compounds Preventing Neurodegenerative Diseases Through Autophagic Activation. *J UOEH*. 2016;38(2):139-48.
61. Hajieva P. The Effect of Polyphenols on Protein Degradation Pathways: Implications for Neuroprotection. *Molecules*. 2017;22(1).
62. Kishimoto S, Uno M, Nishida E. Molecular mechanisms regulating lifespan and environmental stress responses. *Inflamm Regen*. 2018;38:22.
63. Freedland SJ, Carducci M, Kroeger N, Partin A, Rao JY, Jin Y, et al. A double-blind, randomized, neoadjuvant study of the tissue effects of POMx pills in men with prostate cancer before radical prostatectomy. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2013;6(10):1120-7.
64. Pantuck AJ, Pettaway CA, Dreicer R, Corman J, Katz A, Ho A, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the effects of pomegranate extract on rising PSA levels in men following primary therapy for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2015;18(3):242-8.
65. Oliveira MRd. The Effects of Ellagic Acid upon Brain Cells: A Mechanistic View and Future Directions. 2016.
66. Chen P, Chen F, Zhou B. Antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of ellagic acid in liver and brain of rats treated by D-galactose. *Sci Rep*. 2018;8(1):1465.
67. Rangarajan P, Karthikeyan A, Dheen ST. Role of dietary phenols in mitigating microglia-mediated neuroinflammation. *Neuromolecular Med*. 2016;18(3):453-64.
68. Ghavipour M, Sotoudeh G, Tavakoli E, Mowla K, Hasanzadeh J, Mazloom Z. Pomegranate extract alleviates disease activity and some blood biomarkers of inflammation and oxidative stress in Rheumatoid Arthritis patients. *Eur J Clin Nutr*. 2017;71(1):92-6.

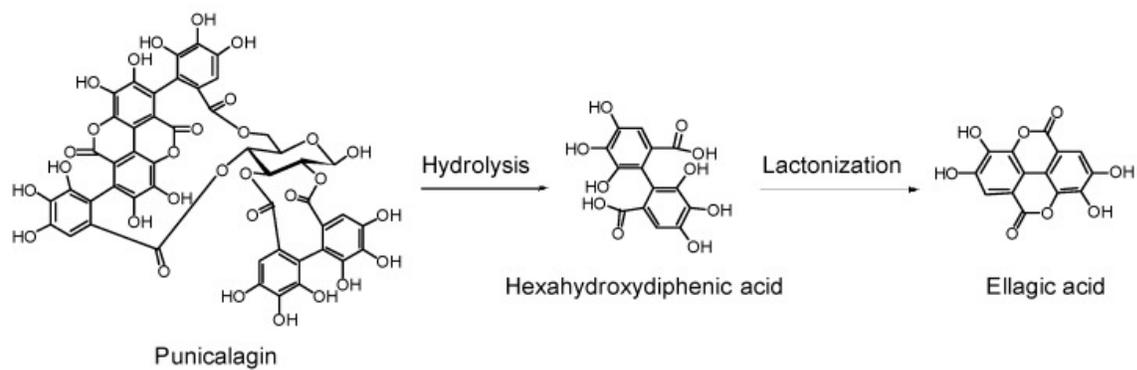
69. Shishehbor F, Mohammad Shahi M, Zarei M, Saki A, Zakerkish M, Shirani F, et al. Effects of Concentrated Pomegranate Juice on Subclinical Inflammation and Cardiometabolic Risk Factors for Type 2 Diabetes: A Quasi-Experimental Study. *Int J Endocrinol Metab.* 2016;14(1):e33835.
70. Asgary S, Keshvari M, Sahebkar A, Hashemi M, Rafieian-Kopaei M. Clinical investigation of the acute effects of pomegranate juice on blood pressure and endothelial function in hypertensive individuals. *ARYA Atheroscler.* 2013;9(6):326-31.
71. Kim YE, Hwang CJ, Lee HP, Kim CS, Son DJ, Ham YW, et al. Inhibitory effect of punicalagin on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, oxidative stress and memory impairment via inhibition of nuclear factor-kappaB. *Neuropharmacology.* 2017;117:21-32.
72. Essa MM, Subash S, Akbar M, Al-Adawi S, Guillemin GJ. Long-term dietary supplementation of pomegranates, figs and dates alleviate neuroinflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120964.
73. Xu J, Yuan C, Wang G, Luo J, Ma H, Xu L, et al. Urolithins Attenuate LPS-Induced Neuroinflammation in BV2Microglia via MAPK, Akt, and NF-kappaB Signaling Pathways. *J Agric Food Chem.* 2018;66(3):571-80.
74. Shema-Didi L, Sela S, Ore L, Shapiro G, Geron R, Moshe G, et al. One year of pomegranate juice intake decreases oxidative stress, inflammation, and incidence of infections in hemodialysis patients: a randomized placebo-controlled trial. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(2):297-304.
75. Ryu D, Mouchiroud L, Andreux PA, Katsyuba E, Moullan N, Nicolet-Dit-Felix AA, et al. Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents. *Nat Med.* 2016;22(8):879-88.
76. Wetzker R, Rubio I. Hormetic signaling patterns. *Dose Response.* 2012;10(1):83-90.
77. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7(1):65-74.
78. Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology.* 2010;129(2):154-69.

79. Vaccaro A, Patten SA, Aggad D, Julien C, Maios C, Kabashi E, et al. Pharmacological reduction of ER stress protects against TDP-43 neuronal toxicity in vivo. *Neurobiology of Disease*. 2013;55:64-75.
80. Mertens-Talcott SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J, Hingorani L, Derendorf H. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *J Agric Food Chem*. 2006;54(23):8956-61.
81. Wu S, Tian L. Diverse Phytochemicals and Bioactivities in the Ancient Fruit and Modern Functional Food Pomegranate (*Punica granatum*). *Molecules*. 2017;22(10).
82. Aqil F, Munagala R, Vadhanam MV, Kausar H, Jeyabalan J, Schultz DJ, et al. Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. *Food Res Int*. 2012;49(1):345-53.
83. Li Y, Yang F, Zheng W, Hu M, Wang J, Ma S, et al. *Punica granatum* (pomegranate) leaves extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in non-small cell lung cancer in vitro. *Biomed Pharmacother*. 2016;80:227-35.
84. Adaramoye O, Erguen B, Nitzsche B, Hopfner M, Jung K, Rabien A. Punicalagin, a polyphenol from pomegranate fruit, induces growth inhibition and apoptosis in human PC-3 and LNCaP cells. *Chem Biol Interact*. 2017;274:100-6.
85. Amin MM, Arbid MS. Estimation of ellagic acid and/or repaglinide effects on insulin signaling, oxidative stress, and inflammatory mediators of liver, pancreas, adipose tissue, and brain in insulin resistant/type 2 diabetic rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2017;42(2):181-92.
86. Jha AB, Panchal SS, Shah A. Ellagic acid: Insights into its neuroprotective and cognitive enhancement effects in sporadic Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav*. 2018;175:33-46.

Annexe 1

Structure chimique de PU, EA, UA et UB (81)

A



B



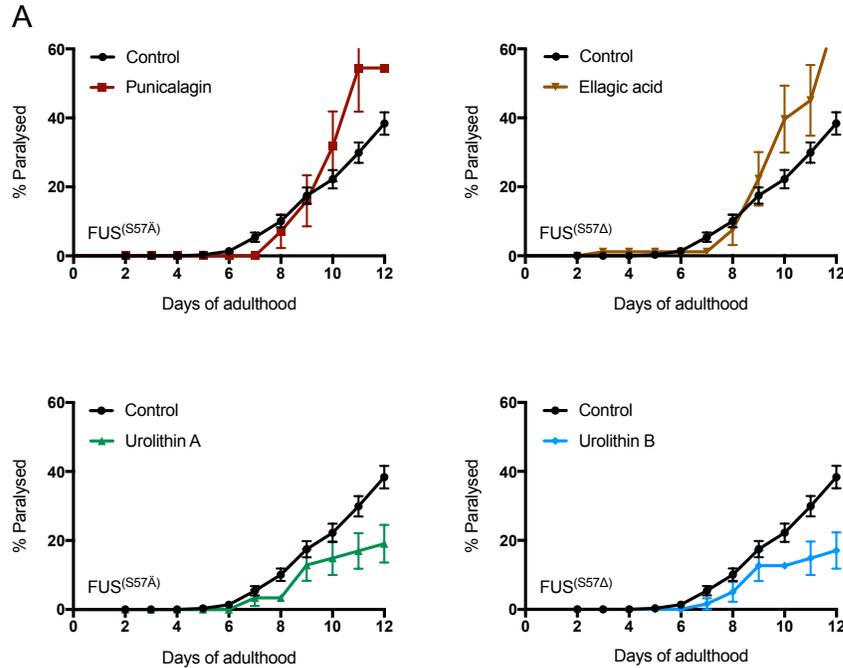
Annexe 2

Revue d'études réalisées avec PU, EA, UA et UB

Composé	Études	Propriétés	Réf.
Punicalagin	- Modèles in-vitro du cancer de la prostate, du poumon, des seins et des cervicales	- Effet antiprolifératif (via diminution de l'expression de MMP-2 et MMP-9, activation de l'apoptose via la voie mitochondriale) et effet antioxydant (diminution des ROS)	(82-84)
Acide Ellagique	- Modèles in-vivo du Diabète de type 2 - Modèles in-vitro et in-vivo d'Alzheimer	- Effet antioxydant via augmentation des niveaux de glutathion et de l'activité des enzymes antioxydants catalase et SOD - Effet antioxydant, diminution de marqueurs de l'inflammation (GFAP et CRP) et des plaques A β	(85) (86)
Urolithin A	- Modèle in-vivo du vieillissement - Modèle in-vitro de neuro-inflammation	- Augmentation de la mitophagie - Effet anti-inflammatoire via inhibition des voies NF- κ B, MAPKs (p38 et Erk1/2), et Akt	(75) (73)
Urolithin B	- Modèle in-vitro de neuro-inflammation	- Effet anti-inflammatoire via inhibition des voies NF- κ B, MAPKs (p38 et Erk1/2), et Akt	(73)

Annexe 3

Les extraits de Pomme-grenade deviennent toxiques à haute concentration mais pas leurs dérivés métaboliques.



Les extraits de Pomme-grenade deviennent toxiques à haute concentration mais pas leurs dérivés métaboliques. (A) Avec une concentration de 50 μ M Punicalagine et acide ellagique ont eu un effet toxique sur la paralysie de vers FUS mutants mais pas urolithin A et urolithin B. Test Log-rank (Mantel-Cox), $P < 0,001$, ($n \approx 270$).. Les valeurs sont exprimées comme la moyenne \pm S.E.M.

