

Sara Merimi

RÔLE DES ACIDES GRAS OMÉGA 3 DANS LES PROCES  
INFLAMMATOIRES DANS LA CULTURE MIXTE DE NÉVROGLIE

TRAVAIL DE FIN DE DEGRÉ

Dirigé par Dr. Jaume Folch

Licence en nutrition humaine et diététique



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus, 2016



## Introduction

Il est estimé qu'entre le 5 et 8% de la population de plus de 60 ans souffre de démence. La maladie d'Alzheimer est la cause de démence plus fréquente, avec environ le 70% des cas. Cela a un important coût social et économique, notamment dans la santé.

Dans l'étiologie, précédemment était considéré que les facteurs physiologiques et la susceptibilité génétique étaient les seuls impliqués. Cependant, nous avons vu récemment que le régime alimentaire, parmi d'autres facteurs tels que le tabagisme, l'obésité, la diabète, et les accident vasculaire cérébraux, etc. jouent un rôle décisif dans son émergence<sup>1</sup>.

Il a été décrit que le stress oxydatif affecte le fonctionnement normal des mitochondries, cet événement est clé dans la mort neuronale JS de Guimarães et al, 2009. Ce stress résulte de la génération d'un grand nombre de dérivés d'espèces réactives de l'oxygène (*ERO ou ROS* acronyme en anglais) qui provoquent la dégradation des protéines et des lipides<sup>2</sup>. Robinson JG et al., 2010 explique que l'augmentation de la production des peptides  $\beta$ -amyloïdes, comporte, entre autres effets, la surproduction de ROS, la libération des cytokines, démyélinisation et l'activation de la cascade inflammatoire et de l'apoptose des cellules<sup>3</sup>.

Le stress oxydatif et l'inflammation ressemblent jouer un rôle clé dans l'initiation et la progression des maladies neurodégénératives<sup>2</sup>.

Dans le système neuronal, les cellules gliales sont chargées de réguler les concentrations extracellulaires des ions, des métabolites et des neurotransmetteurs. Ceux-ci manifestent des récepteurs hormonaux, comme celles de la mélatonine, des hormones thyroïdiennes et des stéroïdes, comme l'ocytocine, la leptine, la corticotropine, le glucagon, l'insuline et l'IGF-I. Il semble que les cellules gliales jouent un rôle critique comme médiateurs des messages hormonaux dans le système nerveux.

Les cellules gliales sont classées en deux grands groupes : la micro et la macroglie. La microglie, se compose par les macrophages qui régulent la réponse inflammatoire dans le système neuronal. La Macroglie, est divisé en quatre cellules spécialisées : les cellules épendymaires (en contact direct avec le cerveau, et surtout présent dans les ventricules), les cellules de Schwann et les oligodendrocytes (responsable de la formation de la gaine de myéline et de réguler l'excitabilité des axones) et l'astroglie (c'est le group plus hétérogène, ils sont en chargées du traitement et de la maintenance de contact avec les vaisseaux sanguins, neurones et autres cellules gliales)<sup>4</sup>.

La communication entre le système immunitaire et le système nerveux dépend, en grande partie, des Cytokines pro-inflammatoires Skaper SD et al, 2012. L'astroglie et la microglie, constituent une source importante de médiateurs inflammatoires et peuvent avoir un rôle fondamental dans le système nerveux central et dans le développement des maladies neurodégénératives. Ces cellules gliales aussi répondent au stimuli pro-inflammatoires libérés par les cellules immunitaires<sup>5</sup>.

Les acides gras oméga-3  $\omega$ -3, peuvent participer activement dans les fonctions cognitives en personnes âgées. Dans les  $\omega$ -3, l'acide docosahexaénoïque DHA, est le principal constituant des membranes neuronales, ainsi que l'EPA acide eicosapentaénoïque. Ils ont montré des plusieurs avantages dans le fonctionnement, l'inflammation, l'oxydation et la mort neuronale. Robinson JG et al., 2010<sup>3</sup>.

Les  $\omega$ -3 ne peuvent pas se synthétiser de nouveau dans les mammifères, sinon qu'ils dépendent du régime alimentaire. Sa présence dans le cerveau, est grâce à deux facteurs, à l'ingestion de ces acides avec la diète, et grâce à la conversion des précurseurs présentes dans la diète comme le  $\alpha$ -linoléique dans le foie<sup>6</sup>.

Le DHA est un acide  $\omega$ -3 essentiel, environ le 60% des acides gras insaturés dans les membranes neuronales sont DHA, donc c'est le plus commun dans le cerveau humain. Il participe en la neurotransmission, la formation des canaux ioniques et la plasticité synaptique. Ceci suggère un rôle clé du DHA dans la mémoire, l'apprentissage et les processus cognitifs. En jeunes rats, l'administration de DHA conduit à une meilleure capacité d'apprentissage. Pour une autre partie, le DHA est impliquée dans la différenciation neuronale, neurogenèse et la protection contre la perte synaptique. Par conséquent, est discutée que le DHA pourrait être impliquée dans pressieuses pathologiques de l'Alzheimer<sup>7</sup> et la neurodegeneration.

Il a été démontré que la différenciation neuronale et la carence en acides gras  $\omega$ -3 au cours du développement, induit des dommages aux tâches d'apprentissage hippocampe-dépendantes<sup>8</sup>. Il y a certaines études épidémiologiques où s'a pu vérifier la réduction de l'incidence de démences avec la consommation de DHA, comme dans l'étude PAQUID. Depuis 7 ans de suivi, a été constaté que la consommation de produits marins et de poissons diminue l'incidence de l'Alzheimer<sup>9</sup>. Aussi de la même façon conclut l'étude CHAP montrant que la consommation de  $\omega$ -3, peut réduire le risque de la maladie d'Alzheimer<sup>10</sup>.

Dans une autre étude où ont été suivis 899 hommes et femmes âgés de 76, sains, pendant 9 ans pour voir les causes de l'évolution de la maladie d'Alzheimer par rapport à la consommation de DHA. Ont conclu que la consommation de DHA réduit 47 % des démences, surtout les participants qui n'avaient pas l'allèle ApoE  $\epsilon$ 4<sup>11</sup> 7.

En Comparaison un régime avec un excès d'acides gras saturés comme l'acide palmitique, induit une inflammation périphérique et hypothalamique. Ce processus est médié par l'activation de la microglie, qui contribue à une dérégulation métabolique. L'activation de ces cellules s'effectue par la translocation du *facteur nucléaire Kappa beta* NF $\kappa$ B, et l'augmente des cytokines proinflammatoires *facteur de nécrose tumorale*  $\alpha$  TNF $\alpha$  et interleukine6 IL-6<sup>12</sup>.

L'alimentation est un facteur clé impliqués dans le développement de maladies multifactorielles, comme c'est le cas de démences d'apparition tardive et en sa forme sporadique, comme dans le cas de l'Alzheimer avec sa forme plus courante. En particulier, le contenu en matières grasses de l'alimentation est un facteur clé dans le développement des processus inflammatoires<sup>13</sup> qui, comme se peut observer dans l'image 1 (adaptation de Folch J, et al 2015)<sup>14</sup>, est l'un des facteurs clés dans le processus neurodégénératif.

Par conséquent, il est très important de trouver des substances antiinflammatoires et neuroprotecteurs. L'objectif général de cette étude est d'évaluer l'efficacité des acides gras  $\omega$ 3 (acide docosahexaénoic DHA et EPA acide eicosapentaénoïque), à une concentration de

60µM, en la réduction de l'inflammation dans la culture mixte de névroglie, stimulée avec un cocktail des cytokines. Les résultats ont été comparés avec celles d'un acide gras saturé, acide palmitique, comme control négatif. On part de l'hypothèse que l'EPA et le DHA diminuaient l'inflammation à la dose de 60µM en diminuent la sécrétion de l'ON et à partir de l'inhibition de la manifestation de certaines protéines de la cascade d'inflammation comme la P38 et l'iNOS. Aussi que l'acide palmitique produit une inflammation très significative à la même dose.

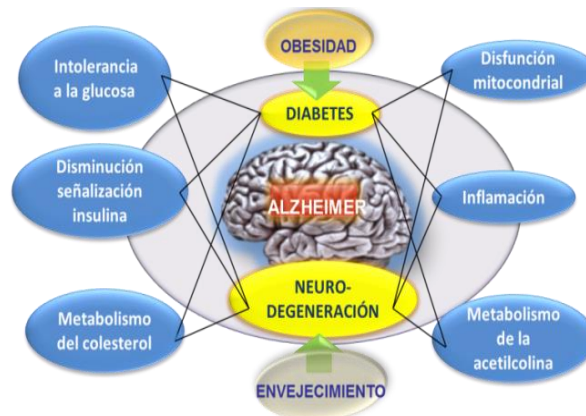


Image1. (Adaptation de Folch J, et al 2015 ) Facteurs qui prédisposent à la apparition et progression des maladies neurodégénératives.

Dans des processus associés à l'inflammation, nous trouvons quelques protéines, telles que *protéine kinase mitogène* p38-MAPK qui participe activement dans l'inflammation. La régulation de la biosynthèse des cytokines pro-inflammatoires, est due par les cytokines TNFα et IL-1β, entre d'autres qui se chargent de la signalisation extracellulaire. Aussi provoquent l'activation de *l'oxyde nitric synthase* iNOS et comme conséquence, l'augmentation de la production de ON<sup>15</sup>.

La diminution de l'énergie qui se produit dans les cellules en raison de la résistance à l'insuline, dans les neurones, s'active l'AMP- Protéine kinase activé AMPK, responsable de la production de la réponse apoptotique et inflammatoire cellulaire dû au stress. En revanche, ce stress causé dans la cellule, affecte les mitochondries, ce qui favorise la formation et l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène, ainsi la formation de l'oxyde nitrique comme on peut observer dans l'image 2 (Adaptation de Folch J, et al 2013)<sup>16</sup>.

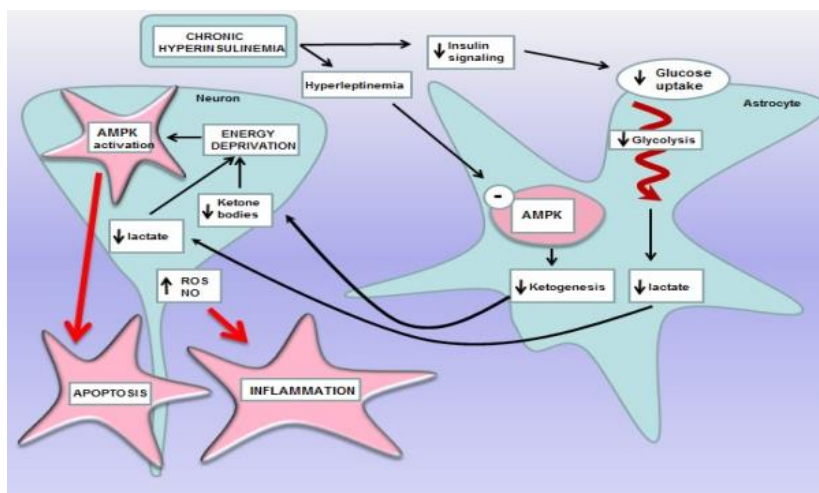


Image2. (Adaptation de Folch J, et al 2013) Activation de l'inflammation et apoptose et génération de l'ON en réponse à la résistance à l'insuline et la diminution de l'énergie.

## Matériel et méthodes

### Modèle Animal

Dans cette étude ont été utilisées souris C57BL/6 de trois jours (p2-5) (Harlan, IN, USA). Le traitement des souris après l'accouchement a été effectué conformément à la Directive 86/609EEC du Conseil de l'Union européenne et les procédures établies par le *Departament D'agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya*. Il s'est procuré faire le possible pour minimiser la souffrance des animaux et de réduire le nombre d'animaux utilisés pour les expériences au cultives cellulaires.

### Cultive cellulaire glial mixte

Ils ont été distribuées dans deux plaques de 35mm avec 2ml de PBS stérile chacune où ils ont été déposés les cerveaux de rats une fois disséqués. Ont été décapités trois rats deux jours après la naissance, et pulvérisés avec l'éthanol 70%. Les méninges adhérent au cortex s'avaient nettoyées, et déplacées dans une autre plaque nette. L'opération a été répétée jusqu'à 10 rats.

Le cortex a été transféré à la partie supérieure d'une plaque de 100mm, et coupé à l'aide des pinces.

Les fragments ont été transférés avec des pinces dans un tube Falcon de 15ml avec 10ml de PBS. Et ils ont été centrifugés trois minutes à 1000rpm avec une centrifuge sérologique de routeur basculant.

Le surnageant a été décanté et ils ont été ajoutés 12ml de solution 0,25% de trypsine-EDTA (Gibcon) dans PBS, et ils ont été passés à un falcon 250ml qui a été incubé dans un bain d'agitation douce à 37°C pendant 25 minutes.

Plus tard a été ajouté au contenu du tub la solution Stop<sup>1</sup> (DMEM Dulbecco's modified eagle's medium), sans glutamine. (Sigma Cat #:D5671 plus 10 % de sérum de veau fœtal FBS et DNase) pour préparer la digestion et a été pipeté 25 à 30 fois avec une pipette Pasteur stérile avec du coton pour homogénéiser la solution. A été centrifugé à 1000rpm pendant 7 min et le surnageant a été écartée pour suspendre ensuite avec 10ml de la solution finale<sup>1</sup> (DMEM + 20% FBS et gentamicine (0,1mg/ml) plus glutamine (40ml)), avec la pipette Pasteur stérile, et a été laissée sédimenter pendant 10 minutes. De cette façon il nous a permis de prendre seulement surnageant *clump-free* et de le passer à un Falcon de 15ml.

Finalement, le comptage des cellules a été effectué avec une chambre de Neubauer afin d'ajuster la densité cellulaire à 300.000cellules/ml avec la solution finale.

Ils ont été déposés dans des plaques à raison de 20ml/250ml et ils ont été déposés à l'incubateur.

---

<sup>1</sup>Annexe 1

## Traitement du cultivate

Pour le changement du milieu de culture, a été utilisé la même solution finale que celle du cultivate cellulaire, mais en changeant le pourcentage de FBS (Annexe 1).

Pour chaque plaque de 5ml, a été préparé dans un Falcon de 15ml, 5mg de gentamicine, 29.25mg de glutamine, 10ml 20% FBS, et a été complété jusque volume final avec DMEM et a été filtré (filtre 22mm). Finalement ont été ajoutées les cytokines \*.

\* **Cocktail de cytokines:**

IL-1B	0.2µl/ml
IFNγ	0.2µl/ml
TNFA	0.2µl/ml

\* Le milieu de culture a été changé caque 3-4 jours, en diminuant le FBS à 15% la première semaine et à 10% pendant la deuxième. Les cellules ont été considérées prêtes pour l'expérience après 21 jours in vitro.

## Test MTT (*viabilité cellulaire*)

Ont été ajoutés 10µl de solution de MTT<sup>2\*</sup> à chacune des plaques de 96 puits. (En plaque de 24, ont été ajoutés 50 µL).

A continuation ont été laissées incubé les plaques pendant 1 heure à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Après cette heure a été absorbée le milieu de culture, soigneusement de ne sucer pas le précipité formé au fond de la plaque. Ensuite a été ajoutée la solution *distaining*<sup>2\*\*</sup> à la raison de 200µl/puits (sur une plaque de 96), avec laquelle il a été réussi à dissoudre le précipité formé.

Ont été laissées 5 minutes à température ambiante et agitées un peut les plaques pour homogénéiser la solution. Postérieurement ont été lus les plaques sur le spectrophotomètre.

Cet essai est basé sur la relation métabolique du *bromure de 3-(4,5-dimethyliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol* (MTT) produit par l'enzyme mitochondriale succinate déshydrogénase dans un compost colorée de couleur bleu (formasan), en permettant de vérifier la fonctionnalité des mitochondries des cellules traitées.

## Greiss (*production de l'ON*)

➤ Réaction :

Pour la production de 40ml de réactif Greiss, a été utilisé 400mg de Sulfanilamide >= 99% (SIGMA ALDRICH) Cat:5925-1, 40mg de N-(1-Naphthyl) *ethylendiamine dihydrochloride* (ALDRICH) N9123 - 10G, 2ml d'acide phosphorique et H<sub>2</sub>O Milli-Q jusque volume finale.

Sur une plaque de 96 autoclavé, sont ajoutés 100µl de milieu de culture et 100µl de réactif dans chaque puits.

---

<sup>2</sup>Annexe 2

➤ Interprétation :

À première vue, les puits étaient plus rougeâtres lorsqu'il avait plus de production d'oxyde nitrique.

Dans le spectrophotomètre, a été déterminé l'absorbance à 570nm (*spectrophotomètre plaques Biotech Power Wave x S2*). Cette lecture nous a proportionné des valeurs basées sur un modèle de ligne patronne faite avec NaNO<sub>3</sub>. L'absorbance, nous indiquait les nitrites d'où nous avons pût faire une relation avec l'oxyde nitrique. ON a été lu à 24h d'après l'incubation avec les acides gras.

### Test Hoechst 33342

*Hoescht 33342*, aussi connu sous le nom de *bisbenzimidazole* H33342 (Sigma-Aldrich), est un colorant spécifique des régions d'ADN qui sont riches en adénine et thymine. Il peut être utilisé aussi bien pour la détection de l'ADN dans les échantillons de tissus ou des cellules en milieu de culture. C'est un fluorochrome perméable à la membrane plasmique qui s'excite à une longueur d'onde de 343nm (lumière ultraviolette) et qui émet une fluorescence bleu correspondante à une longueur d'onde de 455nm.

Afin de voir les changements morphologiques des nucléés gliales mixtes, ont été colorées avec *Hoechst 33342* afin d'observer l'action du toxique et du traitement, en comparant avec la morphologie du contrôle. Les Puits de traitement ont été incubés après avoir effectué les lavages pertinents (3 fois avec PBS 1X5 minutes) pour enlever le traitement résiduel et de cette façon avoir une plus grande perméabilité de la cellule.

Les cellules ont été perméabilisées avec PFH à 4%, ensuite ont été procédées à enlever le milieu de culture et à bloquer avec 5% l'albumine de sérum bovine (BSA) pendant 30 min à température ambiante. Après 3 lavages, ont été incubées avec *Hoechst* et avec la concentration nécessaire pour le marquage des nucléés (selon le fabricant Dil : 0,5-1mg/ml; 81845 *Sigma-Aldrich*, Espagne). Après cela ont été incubées pendant 35 à 45 minutes dans une chambre de cultures dans des conditions optimales (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>), une fois a été écoulé le temps d'incubation ont été réalisées 3 lavages avec PBS 1X stérile pour enlever les restes de produit et que la visibilité au microscope soit bonne. Finalement, a été observé au microscope (*Olympus BX61*).

### Extraction des protéines totales

Les cellules ont été lavées dans 5ml de PBS, les plaques ont été raclées avec 1,5ml de PBS froid et ont été cueillit dans deux *ependorfs*. Puis centrifugées à 10.000rpm pendant 10 min à 4°C. Le pellet des deux *ependorfs* a été suspendu dans 120µL de *Ripa buffer*<sup>3\*</sup> (peut être conservé à - 80°C si il ne s'utilise pas immédiatement). Les échantillons ont été incubés pendant 5 min à 4°C, et ont été centrifugées à 13.500rpm pendant 30 secondes à 4°C. Finalement a été recueilli le surnageant dans un nouveau *ependorf* du quel a été extrait une aliquote de 5µl pour la détermination de la concentration des protéines (méthode de *Bradford*).

---

<sup>3</sup> Annexe 3



## Western blot

La technique du *Western blot* permet d'observer les niveaux d'une protéine spécifique et combine avec un processus de la migration électrophorétique avec l'immunodétection. L'électrophorèse permet la séparation des protéines dans un gel d'acrylamide selon leur masse moléculaire.

Après le traitement de cellules avec DHA, EPA et cytokines les cellules ont été lavées deux fois et réfrigérées avec du glace et une solution saline, ils ont été recueilli dans un tampon de lyse qui contienne NaCl 150mM, 5mM tamponnée avec phosphate MgCl<sub>2</sub>, 50mM Tris, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 7.2 avec inhibiteurs de protéase (complet, *Roche Diagnostics*, Allemagne). Ensuite les extraits homogénéisés ont été centrifugés à 13000 G pendant 15 minutes à 4°C, et le surnageant a été conservé à -80°C pour une utilisation ultérieure. La détermination de la fraction protéique a été faite en suivant les essais de l'*acide* Bicinchoninique (BCA) et la méthode de *Bradford*.

### ➤ Détermination par BCA :

La concentration de la protéine a été déterminée à l'aide de la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) (*Pierce Company*). Pour cela ont été ajoutés 48µl H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q à 2µl de extrait des protéines, 1 ml de réactif de BCA (réactif A + réactif B, en ratio 50:1). Ensuite, ont été incubées pendant 30 min à 65°C et finalement, après laisser rafraichir 5 min, a été procédé à la lecture d'absorbance à 562nm dans un spectrophotomètre de microplaque (*BioRad*, *Benchmark Plus*). La concentration des protéines a été déterminée en interpolant les mesures d'absorbance obtenues sur une ligne de calibrage avec des concentrations connues d'albumine sérique bovine (BSA, 2mg/ml, *Pierce Company*).

### ➤ Détermination par la méthode de Bradford

La fraction protéique a été déterminée par le Kit d'essai de protéines de *Bradford* (*BioRad*). Pour cela ils ont été ajoutés en double, 2µl de l'extrait de protéines du cultivate avec 8µl de H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q avec un ratio de 2:8. Ensuite ont été ajoutés 140µl de réactif de *Bradford* dans les puits standards et l'échantillon problèmes, préparés comme est indiqué par le fabricant. Puis a été laissé reposer pendant 10 minutes à température ambiante dans un endroit sombre. A été procédé la lecture de l'absorbance à 595nm dans un spectrophotomètre *POWER WAVE XS2*, *BioTek*, USA. La concentration des protéines a été déterminée par interpolation des lectures absorbance obtenue sur une ligne de prêt calibré avec des concentrations connues d'albumine sérique bovine (BSA, *standard curve* 0,125-2,0mg/ml, *Quick Start Bio-Rad*).

➤ Préparation de l'échantillon et le gel de polyacrylamide<sup>4</sup> :

Ont été dénaturées une moyenne de 50µl de protéines à 95°C, pendant 5 min dans une solution tampon (0,5M Tris-HCl, pH 6.8, 10% de glycérol, 2% SDS, 5% β-mercaptoéthanol, 0.05% bleu de bromophénol).

Les échantillons ont été chargés sur un gel d'électrophorèse, qui se compose de deux phases : gel de concentration, qui permet de concentrer les protéines chargées, et le gel de séparation, qui sépare les protéines selon leur masse moléculaire.

Une fois les gels ont été polymérisées, ont été déposées dans une cuvette d'électrophorèse *Miniprotean III (BioRad)* avec tampon de migration suffisant (Tris 125mM, glycine de 1,25M, SDS 0,5%) afin que les deux extrémités du gel soient en contact avec le tampon en permettant la fermeture du circuit. Finalement, ont été chargées des échantillons dans le gel, ainsi qu'un marqueur standard de poids moléculaire (*Précision Plus Protein™ Dual Color Standarts, 161-0374; BioRad*). L'électrophorèse a été réalisée à 110 V-120 V le temps suffisant pour que la protéine se puisse séparer selon sa masse moléculaire.

➤ Chargement du gel à la membrane :

Après l'électrophorèse, a été effectué le transfert du gel sur une membrane de polyvinylidène (PVDF, 162-0177; *BioRad*), en utilisant le système *Mini Trans-Blot® (Bio-Rad)*. Ce processus a permis le transfert des protéines à la membrane, où il a été réalisé ultérieurement l'immunodétection des protéines d'intérêt. Le transfert a été effectué à une intensité de courant électrique constante de 200mA à tampon de transfert (Tris 25mM, glycine 190mM, méthanol 20%) et en maintenant la cuvette de transfert à 4°C pendant tout le processus.

➤ Immunodétection

Afin d'effectuer l'immunodétection, ont été extraites les membranes de la cuvette de transfert et ont été lavés avec TBS 1X-Tween® 0.1 % pH 7.4 (TBS-T: Tris 24,25g/L, NaCl 80g/L et Tween20 1ml/L) pendant 5 min. Par la suite, les membranes ont été incubées pendant la nuit à 4°C dans une solution de blocage (5% de BSA en TBS-T) qui contiennent les anticorps primaire d'intérêt.

Après trois lavages de 5 min avec TBS-T, ont été incubées les membranes avec l'anticorps secondaire conjugué à une enzyme peroxydase, TBS-T (tableau III.4) à température ambiante pendant 1 h.

---

<sup>4</sup>Annexe 4

Comme une étape finale de l'immunodétection, les membranes avec TBS-T ont été lavées pour éliminer l'excès d'anticorps secondaire et a été procédé à la détection de la protéine d'intérêt par une réaction de chimiluminescence. Pour ceci il a été procédé avec le contact de la membrane avec la solution de détection (*Amersham ECL Selec TM HARD y BioRad ClarityTM Western ECL substrate*) pendant 1 min. Le revelage du signal chimioluminescent a été réalisé à l'aide du *Chemidoc XRS Bio-Rad®* et sa quantification, grâce à l'utilisation d'un logiciel spécifique pour capturer des images numériques (*ImageLab, Bio-Rad*). A été utilisée la protéine  $\beta$ -actine pour normaliser les résultats, a été immunodetecté sur la même membrane d'intérêt.

À continuation, les membranes de Western blot, ont été lavés avec TBS-T (3 lavages pendant 5 minutes chaque un) et incubées pour 2 heures avec l'anticorps secondaire anti-IgG *Mouse* ou *Rabbit* conjugué avec peroxydase, selon le cas; suivi par le système de détection par chimiluminescence (*Image Molecular XRS montant ChemiDoc + BioRad*) conformément aux instructions du fournisseur. Ont été utilisés les liquides révélateurs pour chaque cas (*Amersham ECL Selec TM HARD*) et (*BioRad ClarityTM Western ECL substrate*). Les mesures de chimioluminescence et les valeurs semi-quantitatives ont été obtenues en utilisant le logiciel approprié *ImageLab, Quantity one (Bio-Rad)* et les résultats ont été exprimés en pourcentage parmi le contrôle. Les  $\beta$ -actines correspondantes ont été prises pour chaque échantillon afin de normaliser les différences en chargement de gel.

Anticorps primaire	Anticorps Secondaire	Maison commercial	Dilution
P38	<i>A. Rabbit</i>	Cell signaling	1:1000
iNOS	<i>A. Rabbit</i>	Cell signaling	1:1000

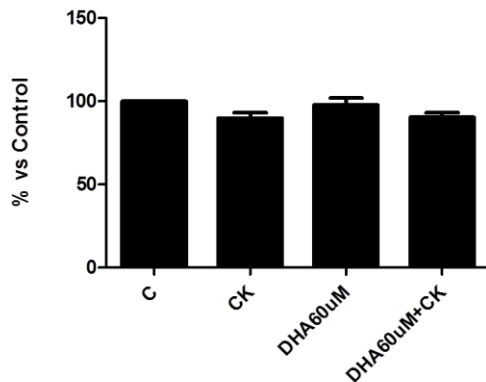
### L'analyse statistique:

Les résultats ont été analysés à l'aide d'ANOVA à un facteur suivie de Bonferroni comparaison de plusieurs essais. Toutes les données ont été analysées avec le logiciel statistique: *IBM SPSS Statistics 22* et *GraphPad Prim 5* et comparés par rapport à leur contrôle (cellules sans traitement). Différences avec \*  $p < 0,05$  ; \*  $p < 0,01$  ;  $p < 0,001$  sont considérées significants dans chaque expérience.

## Résultats

### Le traitement avec DHA (60µM) + CK ne modifie la viabilité cellulaire

**Viabilité (MTT) Cellules de la glie mixte traités avec DHA 60uM et cytokines à 24h**



ANOVA: [F(3,11)=2,990, p>0,05]

Preuve post hoc Benforroni:

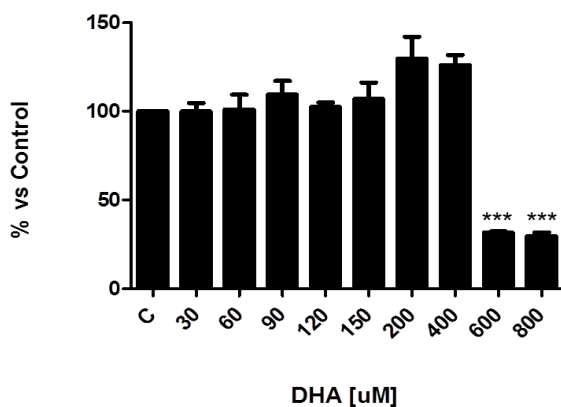
Control CK, DHA60µM, DHA60µM+CK = Ne pas de différences (p>0,05)

**Image 1 . Résultats de la viabilité cellulaire avec la méthode MTT**

On peut observer dans l'image 3 qu'il y a une grande survivance des cellules dans le milieu de la culture avec le DHA 60µM, stimulés avec les cytokines, après 24h d'incubation. La viabilité cellulaire, ne s'est pas altérée, pour le quelle on peut dire que la diminution de l'ON ne se due pas à la morte neuronale, mais grâce à l'administration du DHA. Cependant quand les cellules s'exposent à traitements avec doses hautes 600µM ou plus, la viabilité diminue d'une manière exhausté

### Le traitement avec DHA (60µM) + CK ne produit pas l'apoptose

**Viabilité (MTT) Cellules de la glie mixte traités avec DHA à différentes concentrations**



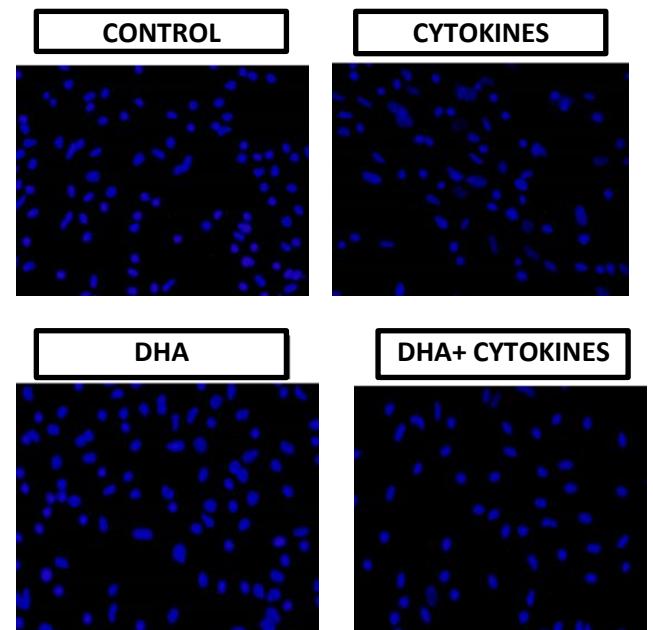
ANOVA: [F(9,29)=27,87, p<0,0001]

Preuve post hoc Benforroni:

Control vs 30µM, 60µM, 90µM, 120µM, 150µM, 200µM, 400µM = Ne pas de différences (p>0,05)

Control vs 600µM, 800µM = Différence (p<0,0001)

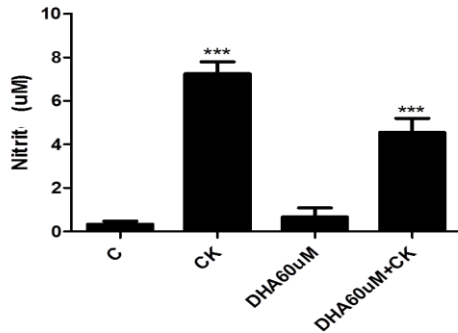
**Image 4.** À doses bas, et jusqu'à 400µM, la viabilité cellulaire ne se voit pas trop affectée. Mais la exposition à des doses très élevées, 600µM de DHA ou plus, supposent une réduction exagérée de cellules vivantes avec une survie inférieure à 50 % des cellules.



**Image 5.** Immuno-coloration des noyaux avec Hoechst ou on peut observer que les cytokines produisent une majeur expansion du noyaux, cependant les cellules traités avec le DHA + cytokines, les noyaux ne présentent pas des expansions, sont plus pareilles au contrôle, ça signifie que les noyaux ne sont pas apoptotiques

## Le traitement avec DHA (60µM) + CK ON diminue la production

La production d'Oxyde Nitrique dans la culture de glie mixte traités avec DHA 60uM et cytokines à 24h



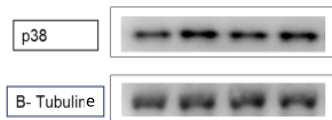
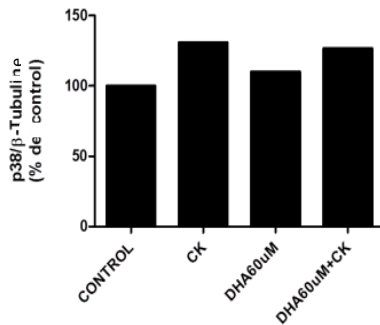
ANOVA: [F(3,27)=48,10 p<0,0001]  
 Preuve post hoc Benforroni:  
 Control CK vs DHA60µM = ne pas des différences (p>0,05)  
 Control vs CK, DHA60µM+CK = différences (p<0,001)  
 CK vs DHA60µM + CK = Différences (p<0,01)

**Image 6.** Les résultats de la production de l'ON avec la méthode Greiss.

La production d'oxyde nitrique observée par Greiss montre une diminution statistiquement significative  $p < 0,001$  respect aux cytokines, par conséquent nous pouvons affirmer que cette dose de 60µM diminue d'une manière significative la production d'ON après 24h d'incubation. (Image 6)

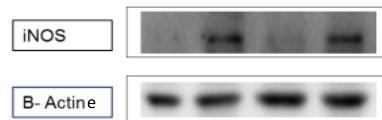
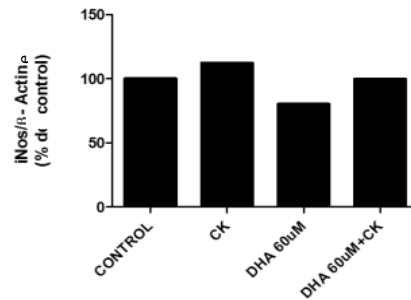
## Le traitement avec DHA ne modifie pas significativement voies de signalisation de l'inflammation

L'effet du traitement avec DHA 60uM et cytokines et cytokines à 24h sur l'expression de p38



**Image 7.** Le traitement diminue l'expression de la P38 qui joue un rôle clé dans la progression de l'inflammation. Les résultats se présentent respect la B-Tubuline pour confirmer que la lecture a été standardisé

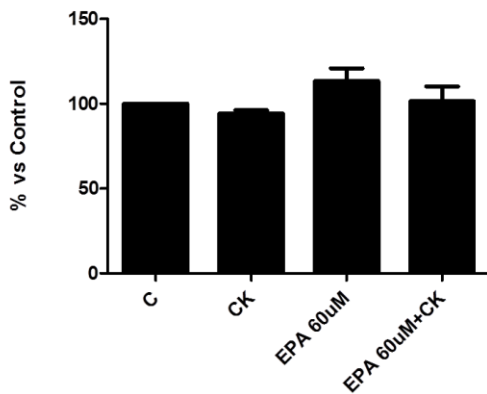
L'effet du traitement avec DHA 60uM et cytokines et cytokines à 24h sur l'expression de iNOS



**Image 8.** Il y a une diminution de la manifestation d'iNOS dans le processus inflammatoire en ajoutant le DHA. Les résultats se présentent respecte la B-Actine pour confirmer que la lecture a été normalisé.

## Le traitement avec l'EPA (60µM) + CK ne modifie la viabilité cellulaire

### Viabilité (MTT) Cellules de la glie mixte traités avec 60µM d'EPA et cytokines à 24h



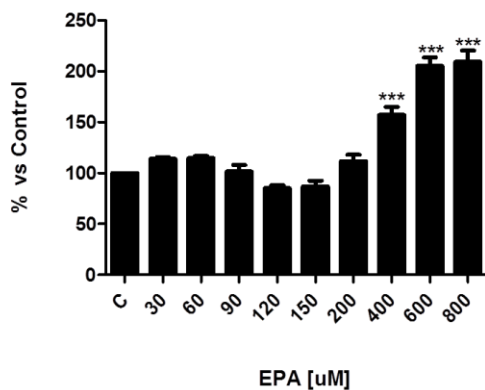
On peut observer que dans l'image 9 il y a une grande survie des cellules dans le milieu de culture avec EPA 60µM plus les cytokines, après 24h d'incubation. La viabilité des cellules ne s'est pas altérée, pour ce qu'on peut annoncer que la diminution de l'ON se due pas à la morte des cellules, mais grâce à l'administration de EPA.

ANOVA: [F(3,11)=1,914, p>0,05]  
 Preuve post hoc Benferroni:  
 Control CK, EPA60µM, EPA60µM+CK = Ne pas de différences (p>0,05)

Image 9. Résultats de la viabilité cellulaire avec la méthode MTT

## Le traitement avec l'EPA ne produit pas l'apoptose

### Viabilité (MTT) Cellules de la glie mixte traités avec EPA à différentes concentrations



ANOVA: [F(9,39)=56,79, p<0,0001]  
 Preuve post hoc Benferroni:  
 Control vs 30µM, 60µM, 90µM, 120µM, 150µM, 200µM = Ne pas de différences (p>0,05)  
 Control vs 400µM, 600µM, 800µM = Différence (p<0,001)

Image 10. La viabilité cellulaire avec le traitement avec EPA ne s'est pas altérée avec l'administration des différentes doses de l'EPA

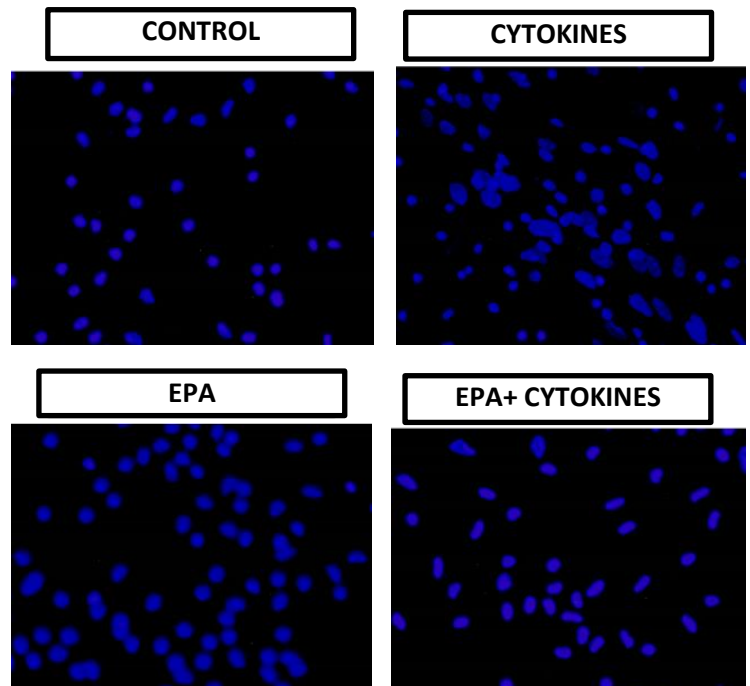
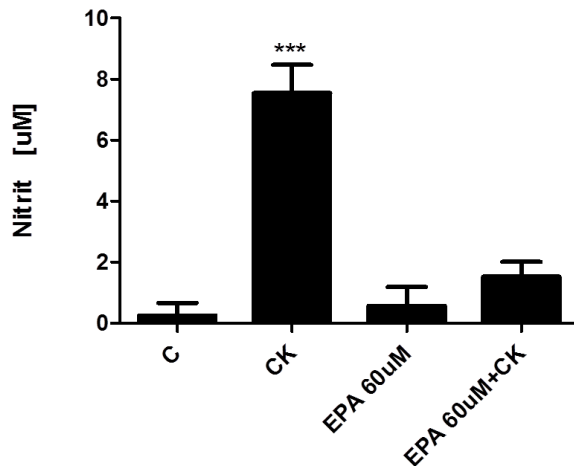


Image 11. Immuno-coloration des noyaux avec Hoechst ou on peut observer que les cytokines produisent une majeure expansion du noyaux, cependant les cellules traités avec le EPA + cytokines, les noyaux ne présentent pas des expansions, sont plus pareilles au contrôle, ça signifie que les noyaux ne sont pas apoptotiques

## Le traitement avec l'EPA (60µM) + CK diminue la production de l'ON d'une manière significative

La production de l'Oxyde Nitrique dans la culture de glie mixte traité avec 60µM d'EPA et cytokines à 24h



ANOVA: [F(3,11)=28,75 p<0,0001]

Preuve post hoc Benferroni:

Control CK vs EPA60µM = ne pas des différences (p>0,05)

Control vs CK = différences (p<0,001)

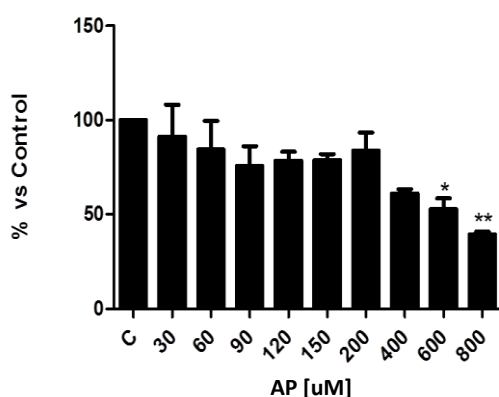
CK vs EPA60µM + CK = Différences (p<0,001)

Image 12. Résultats de la production de l'ON avec la méthode Greiss.

La production d'oxyde nitrique observée par Greiss montre une diminution statistiquement significative p<0,0001 respect aux cytokines, par conséquent nous pouvons affirmer que cette dose de 60µM diminue d'une manière significative la production d'ON après 24h d'incubation. (Image 12)

## Contrôle négatif : Palmitique

Viabilité (MTT) cellulaire de la glie mixte traité avec AP à différentes concentrations



ANOVA: [F(9,19)=4,267, p<0,01]

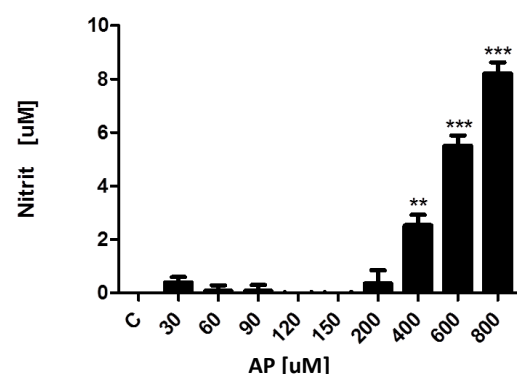
Preuve post hoc Benferroni:

Control vs 30µM, 60µM, 90µM, 120µM, 150µM, 200µM, 400µM = Ne pas de différences (p>0,05)

Control vs 600µM, 800µM = Différence (p<0,05)

Image 13. La viabilité des cellules dans le traitement avec l'acide palmitique avec des basses doses, commence à produire les mortes dans les cellules par rapport au contrôle, comme s'observe avec la méthode MTT.

Production d'Oxyde Nitrique dans la culture de glie mixte traité avec différentes concentrations de AP



ANOVA: [F(9,29)=70,65, p<0,0001]

Preuve post hoc Benferroni:

Control vs 30µM, 60µM, 90µM, 120µM, 150µM, 200µM = Ne pas de différences (p>0,05)

Control vs 400µM, 600µM, 800µM = Différence (p<0,01)

Image 14. À basses doses l'acide palmitique ne produit pas de l'ON, cependant avec hautes doses, la synthèse de l'ON augmente significativement.

## Discussion

Études in vitro ont montré que l'après incubation avec DHA, la production d'interleukines diminue comme la IL-6 ou IL-1 $\beta$  en cellules THP-1 (monocyte provenant de patients atteints de la leucémie aiguë monoblastique), en comparaison avec autre type des acides gras<sup>17</sup>.

Mitjavila MT et al, 2013. Commente que le régime méditerranéen meilleur la concentration lipidique systémique et le stress oxydatif dans les individus avec le syndrome métabolique (qui présentent obésité et diabète, entre autres altérations métaboliques). Les effets bénéficiaux sont visibles spécialement en combinaison de la diète avec l'huile d'olive et fruits secs, avec un haut contenu en acides gras polyinsaturés<sup>18</sup>.

Petrov et al, 2016. Entre plusieurs auteurs, en essais, révisions systématiques et méta-analyses, ont pu associer l'obésité et le surpoids à l'âge adulte et vieillesse, avec le risque de démence<sup>19 20 21</sup>(Image 1 adapté de Folch J, et al 2015)<sup>14</sup>. Verdile G et al, 2015, décrit comment l'obésité et le surpoids sont étroitement liées à l'altération plus caractéristique du diabète de type 2, insulino-résistance. Dans ces processus se produite inflammation<sup>16 22</sup>. Tout ça nous conduite à une connexion entre tous ces processus inflammatoires et le contenu des acides gras de la diète. La population souvent consume plusieurs acides gras saturés, puis que ils sont présents dans la plus part d'aliments prévenants des animaux, aussi dans l'alimentation transformé<sup>23</sup>. En contraposition, il y a moins de consommation des acides gras polyinsaturés comme le DHA et le EPA, présents surtout dans les aliments d'origine marine, fruits secs et semailles. Ça pourrait-il expliquer le protagonisme des acides gras polyinsaturés, en spécial les  $\omega$ 3 et son papier protecteur, dans la littérature actuelle, aussi la controverse du papier des acides gras saturés comme préjudiciels pour la santé, parce qu'on peut les trouver dans des articles comme bénéficiaux grâce à sa richesse en antioxydants<sup>23 24</sup>, mais que avec la transformation des aliments, le pouvoir antioxydant de ces acides diminue à cause de la température, la lumière entre autres facteurs auquel sont subies.

Les nouvelles théories suggèrent que les maladies neurodégénératives, se caractérisent par une augmentation des macrophages et des médiateurs de l'inflammation, cytokines, en général, de la réponse inflammatoire<sup>13</sup>. Cet essai a été conçu d'une manière qui simule cette agression causée par l'immuno-réaction activée par les médiateurs inflammatoires dans le cerveau. Les cytokines dans cet essai sont fois une cause et une conséquence de la progression de l'inflammation.

Dans le cocktail de cytokines ont été utilisés IL-1 $\beta$  TNF $\alpha$  et INF $\gamma$ , parce qu'ils sont des médiateurs pro-inflammatoires<sup>13 25</sup> de qui on a pu vérifier l'efficacité et la puissance inflammatoire individuellement, à chaque cytokines séparément ou en combinaison. Le rôle des cytokines est d'activer les macrophages et les cellules microgliales. Ces médiateurs de l'inflammation jouent également un rôle très important dans l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène ROS et sur l'ON. Ils sont aussi les responsables de l'augmentation de médiateurs de l'inflammation en promouvant la formation et l'augmente des cytokines.



La production de l'ON est régulisée par la iNOS qui est activé lorsque la protéine de P38 est phosphorylée. La P38 est présente à l'intérieur de la cellule aux niveaux basaux et n'est pas activé. En être phosphorylée, commence la chaîne d'activation des protéines et des facteurs qui font augmenter l'ON et la production de cytokines.

Le rôle des acides gras DHA et EPA comme on a vu dans cet essai, à basses doses comme celle de 60µM réduisent la concentration d'ON. Dans le cas du DHA on a pu voir la diminution de la iNOS, responsable de la formation de l'ON. En plus d'inhiber la synthèse de cytokines en réduisant la concentration de médiateurs de l'inflammation en cascade comme le P38 (image 17). En contraposition, dans les résultats obtenus, nous voyons que l'acide palmitique à partir des concentrations basses telles que 60µM ne produit beaucoup d'ON, en revanche à la même dose on voit que la viabilité cellulaire diminue, ça pourrait nous informer que la basse production de ON est due à la morte cellulaire, même si il n'est pas très significative à cette dose. Quand on parle des doses hautes 400µM, et 600µM la viabilité cellulaire diminue significativement. On peut observer cependant qu'à doses élevées, à partir de 400µM L'EPA diminue aussi la viabilité des cellules dans le cas du DHA la diminution significative est à partir de 600µM .

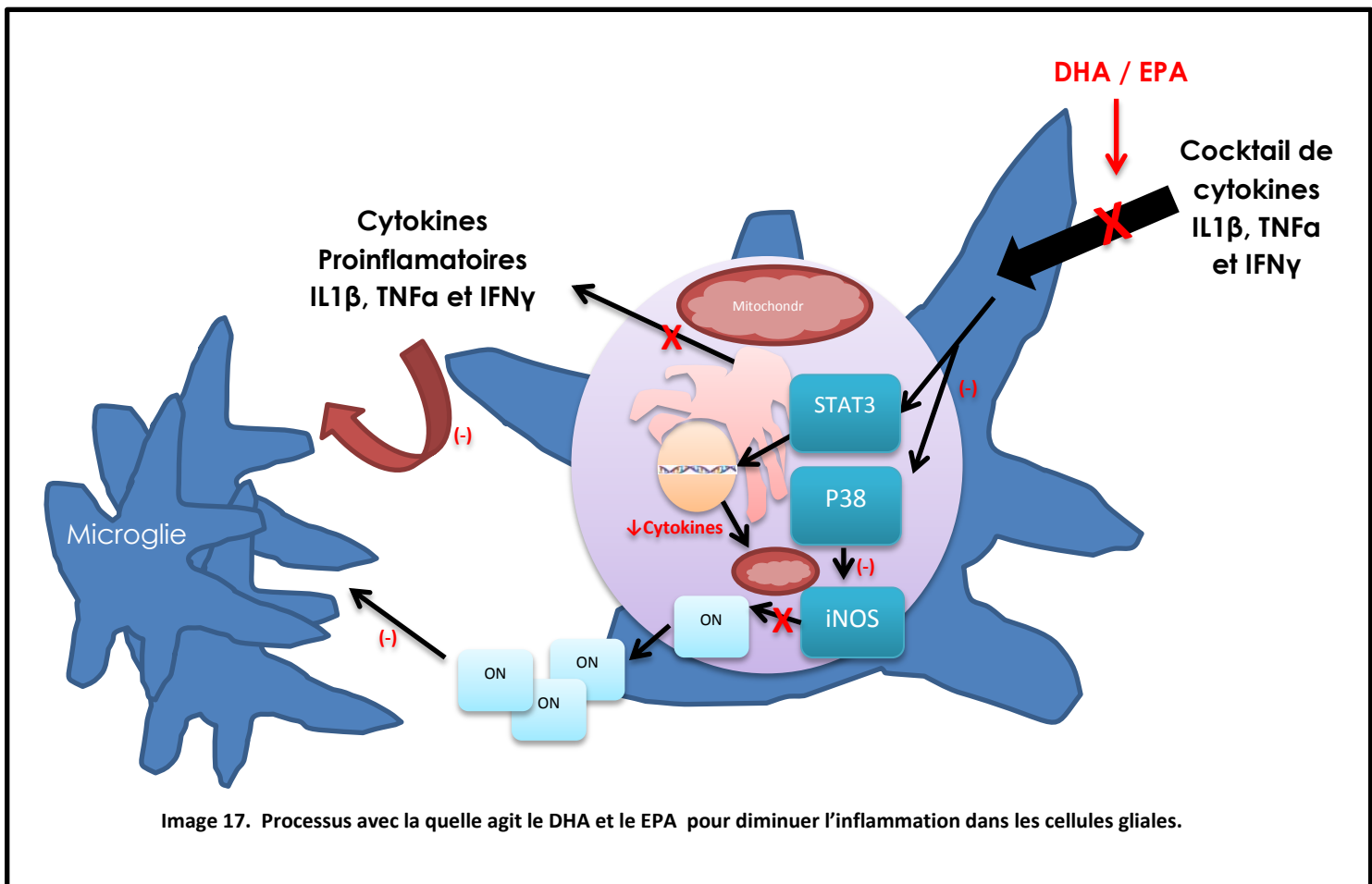


Image 17. Processus avec la quelle agit le DHA et le EPA pour diminuer l'inflammation dans les cellules gliales.

## Conclusions

Dans cet essai nous pouvons expliquer que, selon les résultats obtenus que le DHA et d'EPA à une dose de 60 $\mu$ M peuvent agir comme agent anti-inflammatoire par l'inactivation de la P38, qui favorise la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, ainsi que la diminution d'iNOS, oxyde nitrique synthase, qui augmente la synthèse de l'ON comment il a pu vérifier le test de Greiss. Nous pouvons attribuer un rôle anti-inflammatoire à ces acides gras seulement à certaines doses, depuis de 400-600 $\mu$ M commencent à avoir un effet négatif sur les cellules, en provoquant sa mort. L'acide palmitique à certaines doses si basses ne produit beaucoup d'ON, mais en augmentant la dose, on commence à noter l'effet inflammatoire, en revanche à doses basses déjà commence à tuer les cellules mais pas significativement. On peut conclure que le DHA et l'EPA ont une grande relation avec la diminution de l'inflammation, ainsi qu'ils ont une marge d'action anti-inflammatoire (moins de production d'ON) plus large que l'acide palmitique. Les avantages que nous apportent les  $\omega$ 3 en revanche aux acides gras saturés sont grâce à la dose avec laquelle on les consomme. Il faut plusieurs recherche cliniques pour pouvoir d'extrapoler ces résultats aux humains.

## Conflits d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir aucun conflit d'intérêt.

## Remerciement

Je voudrai remercier infiniment le Dr. Jaume Folch pour m'offrir l'opportunité de former une petite partie de son équipe d'investigation, ainsi que les portes de son laboratoire. À l'Unitat de Bioquímica i Biotecnologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, FMCS de Reus ; À l'Unitat de Farmacologia i farmacognòsia, Instituto de Neurociències UB, Facultat de Farmacia. Universitat de Barcelona; Au Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Institut de Neurociències de l'Universitat de Barcelona de Barcelone et à *Biomedical Reserch Networking Center in Neurodegenerative Diseases* (CIBERNED), de Madrid. Je remercie aussi à la Doctorante Nohora Martinez pour me transmettre une partie très valleeuse de sa connaissance, et pour m'accepter comme une stagiaire et copine de laboratoire. Aussi merci au Dr. Ivan Patraca, Dr. Ignacio Pedrós et Dr. Dmitry Petrov, pour votre aide dans ma formation.

## Abréviations

**ROS:** espèces réactives de l'oxygène

**IGF-I:** Facteur de croissance I ressemblant à l'insuline ou *insulin-like growth factor-1* ( en anglais)

**$\omega$ -3:** Omega 3

**DHA:** acide docosahexaénoïque

**EPA:** acide eicosapentaénoïque

**CHAP:** *Chicago Health and Aging Project*

**ApoE  $\epsilon$ 4:** al·lel  $\epsilon$ 4 de l'apolipoprotéine E

**NFkB:** facteur nucléaire *Kappa beta*

**TNF $\alpha$ :** facteur de nécrose tumorale  $\alpha$

**IFN $\gamma$ :** Interféron gamma

**IL:** interleukine

**ON:** Oxyde nitrique

**P38-MAPK:** protéine kinase mitogène 38

**iNOS:** l'oxyde nitrique synthase

**Cellules THP-1:** monocyte provenant de patients atteints de la leucémie aiguë monoblastique

**AMPK:** AMP- Protéine kinase activé

**Stat3:** Signal transducteur et activateur de la transcription 3

## Bibliographie

1. Qiu C, Kivipelto M, Von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: Occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci*. 2009. doi:10.1097/ALN.0b013e318212ba87.
2. Guimarães JS, Freire MAM, Lima RR, et al. [Mechanisms of secondary degeneration in the central nervous system during acute neural disorders and white matter damage]. *Rev Neurol*. 48(6):304-310. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19291655>. Accessed March 26, 2016.
3. Robinson JG, Ijioma N, Harris W. Omega-3 fatty acids and cognitive function in women. *Womens Health (Lond Engl)*. 2010;6(1):119-134. doi:10.2217/whe.09.75.
4. Garcia-Segura LM, McCarthy MM. Minireview: Role of Glia in Neuroendocrine Function. *Endocrinology*. 2004;145(3):1082-1086. doi:10.1210/en.2003-1383.
5. Skaper SD, Facci L. Mast cell-glia axis in neuroinflammation and therapeutic potential of the anandamide congener palmitoylethanolamide. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012;367(1607):3312-3325. doi:10.1098/rstb.2011.0391.
6. Mueller CP, Reichel M, Muehle C, Rhein C, Gulbins E, Komhuber J. Brain membrane lipids in major depression and anxiety disorders. *Biochim Biophys Acta-Molecular Cell Biol Lipids*. 2015;1851(8):1052-1065. doi:10.1016/j.bbaliip.2014.12.014.
7. Grimm MOW, Zimmer VC, Lehmann J, Grimm HS, Hartmann T. The Impact of Cholesterol, DHA, and Sphingolipids on Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1-16. doi:10.1155/2013/814390.
8. Calderon F, Kim H-Y. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J Neurochem*. 2004;90(4):979-988. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02520.x.
9. Pallegage-Gamarallage MM, Lam V, Takechi R, Galloway S, Mamo JCL. A Diet Enriched in Docosahexanoic Acid Exacerbates Brain Parenchymal Extravasation of Apo B Lipoproteins Induced by Chronic Ingestion of Saturated Fats. *Int J Vasc Med*. 2012;2012:1-8. doi:10.1155/2012/647689.
10. Morris MC, Evans DA, Bienias JL, et al. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2003;60(7):940-946. doi:10.1001/archneur.60.7.940.
11. Schaefer EJ, Bongard V, Beiser AS, et al. Plasma Phosphatidylcholine Docosahexaenoic Acid Content and Risk of Dementia and Alzheimer Disease. *Arch Neurol*. 2006;63(11):1545. doi:10.1001/archneur.63.11.1545.
12. Duffy CM, Yuan C, Wisdorf LE, et al. Role of orexin A signaling in dietary palmitic acid-activated microglial cells. *Neurosci Lett*. 2015;606:140-144. doi:10.1016/j.neulet.2015.08.033.
13. Song C, Shieh C-H, Wu Y-S, Kalueff A, Gaikwad S, Su K-P. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the treatment of major depression and Alzheimer's disease: Acting separately or synergistically? *Prog Lipid Res*. 2016;62:41-54. doi:10.1016/j.plipres.2015.12.003.

14. Folch J, Ettcheto M, Petrov D, et al. Una revisión de los avances en la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer: estrategia frente a la proteína  $\beta$ -amiloide. *Neurología*. May 2015. doi:10.1016/j.nrl.2015.03.012.
15. Lee HS, Kwon SH, Ham JE, et al. Zaprinst activates MAPKs, NF- $\kappa$ B, and Akt and induces the expressions of inflammatory genes in microglia. *Int Immunopharmacol*. 2012;13(3):232-241. doi:10.1016/j.intimp.2012.04.013.
16. Folch J, Pedrós I, Patraca I, Martínez N, Sureda F, Camins A. Metabolic basis of sporadic Alzheimer's disease. role of hormones related to energy metabolism. *Curr Pharm Des*. 2013;19(38):6739-6748. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23530509>. Accessed March 26, 2016.
17. Amigó-Correig P, Bulló M, Márquez-Sandoval F, Vizmanos-Lamotte B, Alegret C, Salas-Salvadó J. Importancia de la dieta en la inflamación. [www.didac.ehu.es/antropo](http://www.didac.ehu.es/antropo). Accessed March 28, 2016.
18. Mitjavila MT, Fandos M, Salas-Salvadó J, et al. The Mediterranean diet improves the systemic lipid and DNA oxidative damage in metabolic syndrome individuals. A randomized, controlled, trial. *Clin Nutr*. 2013;32(2):172-178. doi:10.1016/j.clnu.2012.08.002.
19. Pedditizi E, Peters R, Beckett N. The risk of overweight/obesity in mid-life and late life for the development of dementia: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Age Ageing*. 2016;45(1):14-21. doi:10.1093/ageing/afv151.
20. Gardener SL, Rainey-Smith SR, Martins RN. Diet and Inflammation in Alzheimer's Disease and Related Chronic Diseases: A Review. *J Alzheimers Dis*. 2015;50(2):301-334. doi:10.3233/JAD-150765.
21. Petrov D, Pedrós I, Artiach G, et al. High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2015;1852(9):1687-1699. doi:10.1016/j.bbadis.2015.05.004.
22. Verdile G, Keane KN, Cruzat VF, et al. Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:105828. doi:10.1155/2015/105828.
23. Mancini A, Imperlini E, Nigro E, et al. Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. *Molecules*. 2015;20(9):17339-17361. doi:10.3390/molecules200917339.
24. Oda OJ, Ofori S, Maduka O. Palm oil and the heart: A review. *World J Cardiol*. 2015;7(3):144-149. doi:10.4330/wjc.v7.i3.144.
25. Chen S, Zhang H, Pu H, et al. n-3 PUFA supplementation benefits microglial responses to myelin pathology. *Sci Rep*. 2014;4:7458. doi:10.1038/srep07458.

## Annexe 1

### ➤ Solutions :

**Poly-L-lysine 10x(5mg/50ml):** dans un Falcon de 15ml, stérile, -20°C a été préparé la quantité suffisante de Milli-Q pour couvrir la surface de la plaque (0.5ml par puits de la plaque 24mm, ou 1.5ml pour plaques de 35mm, ou 8ml pour plaques de 100mm).

**PBS:** en flacon de 500ml, 4°C selon la composition :

NaCl	4,5g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	363mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	105mg
H <sub>2</sub> O Milli-Q	q.s.p 500ml

Ajuster le pH : 7.4

**Milieu de culture DMEM (*Dulbecco's modified eagle's medium*), sans glutamine.** Sigma Cat #: D5671, flacon 500ml, de 4°C.

**Sérum de veau fœtal FBS:** Falcon de 15ml, à -20°C. Heat inactivated (30 min ,56°C)

**La trypsine-EDTA 0,25 % (Gibcon):** Falcon de 15ml, -20°C.

### ➤ Solutions stériles:

**Solution Stop:** DMEM + 10% FBS + DNase (12ml):

A été préparé un Falcon de 15ml non stérile, avec 2mg de DNase qui a été dissoute dans hotte de flux avec 10,8 ml de DMEM. S'est filtrée à travers un filtre stérile (diamètre 0,22) sûr un Falcon 15 ml stérile et s'est ajoutée 1,2 ml FBS.

**Solution finale:** DMEM + 20% FBS et gentamicine (0.1mg/ml) plus glutamine (40ml):

A été préparé un Falcon de 15ml non stérile, avec 4mg de gentamicine et 23.4mg de glutamine qui a été dissoute dans 10ml de DMEM. Il a été utilisé un filtre stérile sur un flacon stérile de 50ml et ont été ajoutés 8ml de FBS et 22ml de DMEM.

## Annexe 2

**\*MTT:** bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-ilo)-2,5-diféniltétrazol :

Pour la préparation de la solution MTT, on doit maintenir le ratio 2.5mg MTT/millilitre PBS (le MTT est photosensible, c'est pour ça qu'on doit protéger la dissolution de la lumière).

**\*\*Solución distaining:**

50ml de solution *distaining*: 5g de sodium dodécyl sulfate SDS dans 40ml de diméthylsulfoxyde DMSO auquel a été ajouté 57.2µl d'acide acétique glacial/10ml de DMSO, et a été complété à 50ml avec le DMSO.

Pour conserver la solution, a été utilisé un Falcon de 50ml (qui peut être stocké à température ambiante).

### Annexe 3

**\* Ripa búfer :**

100mM PMSF ( <i>Phenylmethanesulfonyl Fluoride</i> )	10µL/ml
1M OVNa ( <i>Sodium Orthovanadate</i> )	10µL/ml
1.4mg/ml Aprotinine	3.57µL/ml
1M NaF (NO)	50µL/ml

### Annexe 4

Préparation du gel pour le Western blot

Composants	Gel de séparation	Gel de 4 % de concentration
	10%	
Acrylamide- bisacrilamide 40%	3.8ml	1.250ml
TRIS-HCL 1.5 pH 8.8	3.750ml	-----
TRIS-HCL 1.5 pH 6.8	-----	1.250ml
SDS 10%	170µl	100µl
H <sub>2</sub> OmQ	7.340ml	7.500ml
TEMED	10µl	10µl
APS	100µl	50µl