Des suppléments alimentaires qui exercent des effets neuroprotecteurs dans le modèle d'Accident Vasculaire Cérébral ischémique.

Takao Yasuhara,[1] Koichi Hara,[1] Mina Maki,[1] Tadashi Masuda,[1] Cyndy D. Sanberg,[2] Paul R. Sanberg,[3] Paula C. Bickford,[3,4] et Cesar V. Borlongan[1,5]

Traduit de l'Américain par Jacques Prunier.

Ce document est la propriété de «SynerJ Health Gmbh»
Toute utilisation totale ou partielle doit faire l'objet d'un accord écrit de «SynerJ Health Gmbh»

Résumé

Cette étude a examiné si un supplément alimentaire peut être utilisé pour se protéger contre l'AVC ischémique. Deux groupes de souris adultes males de l'espèce Sprague-Dawley ont initialement reçu du NT-020, un mélange à marque déposée composé de myrtille, de thé vert, de vitamine D3, et de carnosine (*n* 8), ou un véhicule (*n* 7). L'administration de NT-020 et de véhicule a consisté en une dose quotidienne via orale (en utilisant le gavage) pendant une période de deux semaines. Le 14ème jour, après le dernier traitement, tous les animaux ont subis une chirurgie provoquant l'AVC en utilisant l'occlusion par suture de l'artère cérébrale moyenne pendant une heure (MCAo). Pour mettre en évidence les effets fonctionnels du NT-020, les animaux ont été soumis à des tests comportementaux pré-établis juste avant la provocation de l'AVC et à nouveau au lendemain de la chirurgie. ANOVA a révélé un effet du traitement assez significatifs (*p* 0.05), caractérisé par des réductions de 11.8% et 24.4% de l'asymétrie motrice et du dysfonctionnement neurologique, respectivement, chez des animaux traités au NT-020 en comparaison avec les animaux traités au véhicule. L'évaluation du ramollissement cérébral a révélé une décroissance significative de 75% en moyenne de l'aire de cicatrice gliale au niveau du striatum ischémique des animaux traités au NT-020 comparée à celle des animaux traités avec le véhicule (*p* 0.0005). Une analyse quantitative de l'activité de prolifération cellulaire des zones subventriculaires a révélé un accroissement du nombre de cellules positives au BrdU chez les cerveaux traités au NT-020 d'au moins l'équivalent de celui des cerveaux traités au véhicule (*p* 0.0005). Similairement, des analyses quantitatives de marquage au BrdU dans la pénombre ischémique striée ont révélés un accroissement du nombre de cellules positives au BrdU pour les cerveaux traités au NT-020 d'au moins trois fois celui des cerveaux traités au véhicule (*p* 0.0001). De plus, un double marquage généralisé des cellules au BrdU et au Doublecortin a été détecté dans les cerveaux

traités au NT-020 (17% de la partie intacte et 75 % de la partie touchée par l'ischémie), ce qui a été significativement supérieur à celui constaté dans les cerveaux traités au véhicule (5% de la partie intacte et 13% de la partie touchée par l'ischémie) (*p* 0.05). En contraste, seulement un faible nombre de cellules dans les cerveaux traités au NT-020 ont été doublement marquées au BrdU et au GFAP (1% de la partie intacte et 2% de la partie touchée par l'ischémie), ce qui a été significativement inférieur aux cerveaux traités au véhicule (18% de la partie intacte et 35% de la partie touchée par l'ischémie) (*p* 0.0001). Des facteurs neurogéniques endogènes ont également été régulés chez les cerveaux ischémiques des animaux traités au NT-020. Ces données démontrent les remarquables effets neuroprotecteurs du NT-020 lorsqu'il est administré avant l'AVC, agissant possiblement par le biais de son potentiel neurogénique.

[1]Département de Neurologie, Faculté Médicale de Georgie, Augusta, Georgia.

[2]Natura Therapeutics, Inc., Tampa, Floride.

[3]Centre d'Excellence pour le Vieillissement et la Guérison du Cerveau, Département de Neurochirurgie, Université de Floride du Sud, Faculté de Médecine, Tampa, Floride.

[4]James A. Haley Administration de l'Hôpital de Vétérans, Tampa, Floride.

[5]Recherche et Service d'Affiliation, Augusta VAMC, Augusta, Georgia.

INTRODUCTION

L'AVC est la troisième cause principale de décès et la principale cause d'incapacité aux Etats Unis, approximativement 2 entre 1000 américains adultes sont victimes de leur premier AVC pour toute année donnée. La thérapie actuelle pour l'AVC se limite à l'activateur plasminogène tissulaire (tPA). Le nombre d'individus affectés, les

coûts nécessaires pour faciliter leur soin et leur réhabilitation, couplés au manqué de thérapies, justifient les efforts significatifs de recherches pour soulager la souffrance des victimes d'un accident vasculaire cérébral.

L'accumulation d'évidences lors de cette dernière décennie indiquent que la neurogenèse se produit dans le CNS du mammifère adulte.[1] La médicine régénératrice a émergé progressivement comme un nouveau domaine scientifique, en valorisant des thérapies utilisant les cellules souches pour traiter des dysfonctionnements cérébraux, en insistant soit dans l'implantation de cellules souches exogènes soit en amplifiant des cellules souches endogènes par la neurogenèse .[2,3] Lors de cette étude nous avons recherché comment des suppléments alimentaires affectent la neurogenèse chez la souris adulte atteinte d'AVC. Des paradigmes important de manipulation alimentaire ont été examinés récemment, comme la restriction alimentaire et le jeûne, dont il a été prouvé qu'ils influencent la neurogenèse.[4–9] En particulier, il a été démontré qu'une restriction calorique augmente la neurogenèse dans les régions neurogéniques du CNS, ce qui a coïncidé avec l'amélioration de déficits histologiques et comportementaux induits par l'AVC[5,10,11] Un examen attentif des régimes de restriction alimentaire révèle que le principe primordial dans la stratégie d' une neurogenèse induite est d'éliminer les calories non désirées. Il est postulé ici que le principe d'une approche neuroprotéctrice aussi solide peut être réalisée en recherchant le paradigme inverse d'augmentation du régime nutritif ce qui devrait également rendre une neurogenèse thérapeutiquement efficace. Ainsi, l'on met en avant le concept unifiant de manipulation du régime qui comprend soit l'élimination des calories néfastes, soit en valorisant le régime nutritif pour obtenir la neuroprotection. Notre hypothèse de neuroprotection induite par la neurogenèse vient compléter le concept de la suppression du stress oxydatif comme un bénéfice aussi probant conséquence du régime nutritif incluant myrtilles,[12,13] thé vert,[14,15] vitamine D3,[16,17] et carnosine,[18,19] compte tenu que ces extraits de plantes sont riches en antioxydants puissants et en composés chélateurs de polyphénol. L'étude proposée va élucider les effets biologiques de l'administration d'un régime à base d'extraits/composés nutritifs dorénavant référés comme le NT-020, pour promouvoir la neurogenèse et extraire les avantages fonctionnels pour un modèle d'AVC.

RECHERCHE EXPERIMENTALE
Conception et Méthodes

Sujets

Des souris mâles, adultes, de l'espèce Sprague-Dawley (Harlan, Madison, WI) pesant environ 250 g ont servi de sujets. Les animaux avaient un accès libre aux aliments et

à l'eau avant et après les interventions chirurgicales. Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées en accord avec les directives d'Augusta NIH pour l'utilisation d'animaux dans la recherche. Les procédures chirurgicales ont été menées sous des conditions d'asepsie, et tous les efforts ont été faits pour minimiser la souffrance des animaux et pour réduire le nombre d'animaux employés.

Dosage du médicament

Les animaux ont été désignés au hasard pour recevoir initialement du NT-020 (*n* 8) ou du véhicule (*n* 7). Lors de l'utilisation de NT-020, les plus forts dosages des composants établis pour promouvoir la prolifération cellulaire la plus élevée dans les études sur les cellules *in vitro*[21] ont été ajustés pour l'administration *in vivo*. Le NT-020 est une formule à marque déposée de myrtille, thé vert, Vitamine D3, et carnosine, établie selon une étude publiée auparavant.[17,21] Cependant, dans cette étude précédente[21] un niveau plus élevé de Vitamine D3 a été inclus dans la formule. Le présent dosage du NT-020 et du véhicule consiste en une administration orale quotidienne (en utilisant le gavage) pendant une période de deux semaines avant l'AVC. Comme l'indiquent Wang et ses collègues[22], un tel régime de dosage du supplément alimentaire dans la période qui précède l'AVC correspond à un dosage thérapeutique pour promouvoir la neuroprotection; cependant la quantité des ingrédients individuels utilisés dans la présente étude est vingt fois moindre que celle des études précédentes.[21,22]

Chirurgie de l'AVC

Au 14ème jour, après le dernier traitement, tous les animaux ont subis une chirurgie pour induire un AVC en utilisant une suture éphémère entraînant l'occlusion de l'artère moyenne cérébrale (MCAo) pendant une heure. Ce modèle d'AVC par MCAo a suivi les procédures décrites dans nos études précédentes.[23–26]

Tests comportementaux

Pour mettre en évidence les effets fonctionnels du NT-020, les animaux ont été soumis à des tests comportementaux pré-établis juste avant l'intervention chirurgicale et à nouveau au 14ème jour après l'AVC. Les tests comportementaux comportaient le test de Bederson et le test d'oscillation du haut du corps (EBST), qui sont respectivement sensibles à des pertes motrices et neurologiques produites par l'AVC. Le test Bederson est conduit en suivant les démarches décrites précédemment.[23,24] Les résultats neurologiques pour chaque souris sont obtenus en utilisant 4 tests qui incluent: (1) l'observation de la rotation homolatérale spontanée, évaluée de 0 (aucune rotation) à 3 (rotation continue);

(2) la rétraction controlatérale du membre postérieur, qui mesure la capacité de l'animal à replacer le membre postérieur après qu'il soit déplacé latéralement de 2 à 3 cm, évaluée de 0 (replacement immédiat) à 3 (replacement après quelques minutes ou aucun remplacement); (3) l'habilité à marcher sur une poutre évaluée de 0 pour une souris qui traverse immédiatement une poutre de 2,4 cm de largeur et 80 cm de longueur, à 3 pour une souris incapable de rester sur la poutre pendant 10 secondes; et (4) la maîtrise bilatérale des membres antérieurs, qui mesure la capacité à accrocher à une tige en acier de 2 mm de diamètre , évaluée de 0 pour une souris avec un comportement normal de prise avec ses membres antérieurs à 3 pour une souris incapable de saisir avec ces membres antérieurs. Les résultats de tous ces 4 tests sont additionnés et la moyenne est calculée pour donner le niveau de déficit neurologique (note maximale, 3).

Le *EBST* nécessite une manipulation de l'animal par sa queue et l'enregistrement de la direction des oscillations. L'animal est doucement pris par la base de la queue et soulevé jusqu' à ce que son nez soit à une hauteur de 5 cm au-dessus de la surface. La direction de l'oscillation, soit vers la gauche soit vers la droite, est comptabilisée une fois que la tête de l'animal se déplace vers le côté approximativement 10 degrés par rapport à la position centrale du corps. Après une seule oscillation, l'animal est replacé dans la boîte de plexiglas et est libre de bouger pendant 30 s avant un nouveau test. Ces étapes sont répétées 20 fois pour chaque animal. Normalement, les souris intactes montrent une tendance à osciller de 50%, c'est-à-dire, le même nombre d'oscillations vers la gauche et vers la droite.
Une tendance d'oscillation de 75% aurait indiqué 15 oscillations dans une direction et 5 dans l'autre sur 20 essais. Le test EBST a été utilisé précédemment, et il a été observé que les animaux atteints d'AVC induit par MCAo présentent une tendance d'oscillation de 75%, lorsque testés le jour de la chirurgie induisant l'AVC (i.e., après la récupération de l'anesthésie), et une telle asymétrie motrice est invariable pour une durée jusqu' à six mois.[27–29] Tous les tests ont été conduits par deux chercheurs inconscients des conditions du traitement.

Analyse du ramollissement Cérébral

A la suite des tests comportementaux du 14ème journée après l'AVC, tous les animaux ont subis l'euthanasie pour évaluer le ramollissement cérébral avec l'utilisation de l'immunocoloration des protéines acides fibrillaires gliales (GFAP).[30] Cette méthode de dosage aux GFAP révèle l'étendue de la cicatrice gliale, qui évalue approximativement le dommage cérébral causé par l'AVC. Bien que le triphenyltetrazolium chloride (TTC) est habituellement plus utilisé pour révéler le ramollissement cérébral, une telle analyse au TTC n'est valable que lorsque effectuée sept jours après l'accident. En utilisant un système d'imagerie au NIH, la cicatrice gliale a été calculée en

capturant des images grâce au AxioPhot (Carl Zeiss, Thornwood, NY) avec un grossissement de 1,6. La zone endommagée a été sélectionnée selon la morphologie des cellules, en se basant sur une infiltration gliale, qui a clairement délimité le centre ischémique de la pénombre ischémique.[30] L'aire principale du dommage ayant de 5 à 6 sections par coupe coronale a été calculée en utilisant la formule suivante: C D/(A B) pour révéler l' aire totale touchée par l'infarctus pour chaque cerveau(voir figure 2A).

Dosage de la prolifération cellulaire

Pour déterminer si la prolifération cellulaire produite par le NT-020 observée *in vitro* se produit également *in vivo*, ce qui pourrait servir d'explication mécanique pour les protections comportementales et histologiques observées, les tâches de BrdU ont été observées dans des régions distinctes du cerveau atteint. Des sections alternées du cerveau obtenues de ces mêmes animaux, traités auparavant au NT-020 ou au véhicule, ont été traitées par immunocoloration au BrdU (50 mg/kg, i.p. toutes les 8 heures pendant les jours 10 à 14 après l'AVC; Sigma, St. Louis, MO) pour révéler la prolifération cellulaire. Les analyses de marquage au BrdU ont été ciblées sur la zone subventriculaire neurogénique (SVZ) et le striatum non neurogénique.

La raison pour se concentrer initialement sur la SVZ est de mettre en évidence le fait que le NT-020 pouvait effectivement augmenter la prolifération cellulaire sur région neurogénique. Bien qu'une augmentation de prolifération cellulaire dans la SVZ pourrait être utilisé comme un indice raisonnable pour soutenir un mécanisme de neuroprotection par l'intermédiaire du NT-020, cette hypothèse a été d'avantage testée en analysant ultérieurement le marquage au BrdU au niveau du striatum ischémique pour révéler si les cellules nouvellement formées de la SVZ sont capables de migrer vers l'emplacement du dommage. Cette migration potentielle nous donnerait des évidences plus solides de l'efficacité thérapeutique du NT-020, au vu qu'une telle donnée démontre le potentiel du composé pour, non seulement augmenter la prolifération cellulaire mais aussi pour faciliter un acheminement adéquat des cellules nouvellement formées vers l'emplacement affecté du cerveau.

Dosage de la différentiation neuronale

Sur cette même lancée pour déterminer la fonctionnalité de prolifération et migration cellulaire, nous avons d'avantage cherché à vérifier si l'augmentation de cellules nouvellement formées due au NT-020 conduit à une expression accrue des phénotypes neuronaux.

Il a été prouvé qu'une telle différentiation neuronale est un marqueur beaucoup plus rigoureux qu'un simple accroissement de la prolifération et de la migration cellulaires, ce qui

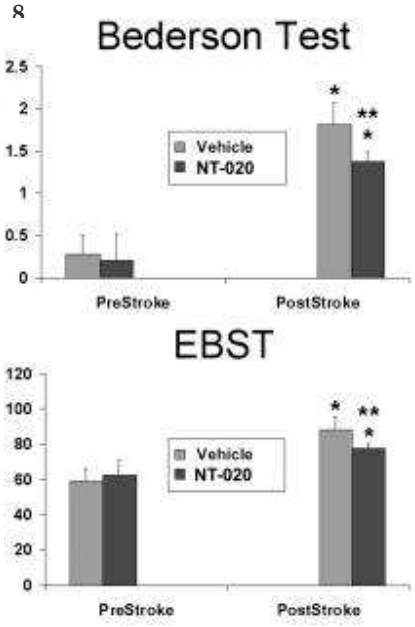
soutiendrait notre mécanisme hypothétique, d'une neurogenèse sous jacente à la neuroprotection par le NT-020.

Des sections de cerveaux marqués au BrdU (i.e., la pénombre ischémique striée), utilisées pour les études ci-dessus sur la prolifération/migration cellulaire, ont été doublement marquées avec un marqueur neuronal Doublecortin ou un marqueur glial GFAP.

ELISA de facteurs neurogéniques réglés par le NT-020

Des preuves accumulées impliquent des facteurs trophiques tels que le facteur de cellule souche (SCF), le facteur neurotrophique dérivé des cellules cérébrale de lignée gliale (GDNF), le facteur neurotrophique (BDNF), et le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF), en tant que facteurs neurogéniques cruciaux.[31–33] Ainsi, nous avons mesuré ces molécules comme des possibles facteurs neurotrophiques réglé grâce au traitement au NT-020. Des quantités égales d'homogénats de tissu cortical strié ont été collectées pour l'ELISA. Des ponctions de tissu du striatum et du cortex ischémiques, ainsi que du striatum et du cortex controlatéraux intacts, ont été utilisées comme sites de prélèvement d'échantillons cérébraux. Pour contrôler la variation entre les souris, nous avons utilisé la matrice du cerveau de souris pour cibler précisément les mêmes striatum et cortex au long de l'axe antéropostérieur (i.e., la troisième coupe du bloc de 2 mm). Ensuite, une ponction de tissu de 2 mm de diamètre (avec l'utilisation d'un poinçonneur de tissu calibré; Harris Micro-Punch, Redding, CA) a été faite immédiatement sous le corps calleux (correspondant au striatum) et une deuxième ponction de 2 mm a été faite immédiatement au-dessus du corps calleux (correspondant au cortex). Ceci a été réalisé bilatéralement, en donnant quatre sites d'échantillonnage par animal. Les niveaux de SCF, de GDNF, de BDNF, et de VEGF ont été déterminés en utilisant les kits ELISA selon le protocole prévu du fabricant (BDNF et GDNF, Promega, Madison, WI; VEGF et SCF, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN). Ces systèmes ELISA peuvent détecter un minimum de 31.2, 15.6, 7.8, et 31.2 pg/mL de SCF, GDNF, BDNF, et VEGF, respectivement. Pour chaque dosage, trois essais ont été réalisés.

FIG. 1. Les évaluations neurologique (test de Bederson) et motrice (EBST) antérieures à la chirurgie induisant un AVC (pre-AVC) ont révélés aucun comportement dissident entre les groupes. Au 14ème jour après l'AVC (post-AVC), quoique les deux groups présentent un déficit (vs. pre-AVC, * p 0.05), les rats traités au NT-020 exposent significativement moins de déficits moteurs et neurologiques que les rats traités au placebo (** p 0.05).



Résultats

Le NT-020 réduit les déficits comportementaux provoqués par l'AVC

L'ANOVA a révélé des effets du traitement significatifs pour les deux tests de Bederson ($F_{3,26}$ 81.65, p 0.0001) et EBST ($F_{3,26}$ 29.26, p 0.0001) (Fig. 1). Des comparaisons appariées entre les groupes de traitement en utilisant les test de Fisher PLSD post-hoc t ont révélés que les groupes traités au NT-020- et ceux traités au placebo n'ont montré aucun handicap comportemental détectable pendant la phase de test pre-AVC, mais les deux groupes ont montré des déficits neurologiques et moteurs lors des test post-AVC (en comparaison avec la phase pre-AVC, p 0.05). Cependant, les animaux traités au NT-020 ont montré significativement moins d'anomalie dans les deux tests, neurologique et moteur, en comparaison avec les animaux traités au véhicule (pour la phase de test post-AVC p 0.05). Des réductions de 24.4% et 11.8% du dysfonctionnement neurologique de Bederson et de l'asymétrie motrice de EBST, respectivement, ont été détectées chez les animaux traités au NT-020 en comparaison avec les animaux traités au placebo. Ces résultats indiquent que le traitement pre-AVC au NT-020 a significativement amélioré les anomalies neurologiques et motrices provoquées par l'AVC.

Le NT-020 réduit les infarctus cérébraux provoqués par un AVC.

Le test t a révélé que le NT-020 a réduit la cicatrice gliale/les zones du striatum endommagées par l'ischémie (Fig. 2a) en comparaison avec le traitement au placebo (Fig. 2b). Une décroissance significative de 75% de l'aire moyenne de la cicatrice gliale a été observée dans le striatum ischémique des animaux traités au NT-020 en comparaison avec celle des animaux traités au véhicule (p 0.0005) (Fig. 2c). Ces résultats histologiques en parallèle avec les performances comportementales de animaux traités au

NT-020, suggèrent qu'une réduction de l'étendue du ramollissement cérébral traduit une atténuation des pertes fonctionnelles dues à l'AVC.

FIG. 2. L'immunocoloration au GFAP a été utilisée pour révéler la cicatrice gliale. **(a)** Calcul de la cicatrice gliale avec la formule C D/(A B), où A correspond à l'aire totale de l'hémisphère, B au ventricule latéral, C à la cicatrice gliale, et D à la pénombre. Le traitement au NT-020 **(a)** a significativement réduit l'aire gliale comparé au traitement avec le véhicule **(b),** comme il est quantifié en **c** (*p 0.0005).

Le NT-020 promeut la naissance endogène de nouveaux neurones

La microscopie en immunofluorescence a révélé que le NT-020 (Fig. 3D-F) augmente la prolifération cellulaire dans le SVZ et le striatum ischémique caractérisé par un marquage au BrdU accru aux emplacements du cerveau indiqués en comparaison avec les cerveaux ayant subi un AVC et traités au véhicule (Fig. 3A-C). Une analyse quantitative de l'activité de prolifération des cellules du SVZ (Fig. 4A) a révélé des effets significatifs du traitement ($F_{3,16}$ 8.03, p 0.0001), avec au moins une augmentation équivalente du nombre de cellules positives au BrdU chez les cerveaux ayant subi un AVC traités au NT-020 en comparaison avec ceux traités au placebo (p 0.0005) (Fig. 3A, B, D, et E, pour les données quantitatives se référer à la Fig. 4B). Similairement, une analyse quantitative de marquage au BrdU dans la pénombre ischémique striée a révélé des effets significatifs du traitement ($F_{3,16}$ 11.84, p 0.0001), avec au moins une augmentation du triple du nombre de cellules positives au BrdU pour les cerveaux atteints par un AVC et traités au NT-020 en comparaison à ceux traités au placebo (p 0.0001) (Fig. 3A, C, D, et F, avec les données quantitatives montrées en Fig. 4C). Par contraste, lorsque l'évaluation du marquage au BrdU était ciblée sur le centre ischémique (au lieu de la pénombre, Fig. 3A et D), il y a eu une prolifération massive de cellules positives au BrdU chez les cerveaux atteints par l'AVC et traités au placebo en comparaison à ceux traités au NT-020. Cette importante augmentation de BrdU dans le centre n'est pas surprenante puisqu' il a été établi que les marqueurs d'infiltration du BrdU réagissent à la microglie, ainsi qu'aux cellules mortes ou en voie de dégénération, qui sont abondantes dans le centre nécrotique.[28,34–36] Puisque les cerveaux ayant subi un AVC traités au NT-020 ont un centre ischémique plus petit, il est supposé que le marquage au BrdU dans cette région est moins important que celui chez les cerveaux traités au placebo. Par conséquence, l'examen de la prolifération cellulaire dans le centre ischémique est présenté comme une donnée construite de toutes pièces et peut ne pas traduire véritablement l'index neuroprotecteur du marquage au BrdU. Avec cela à l'esprit, nous avons limité l'évaluation de la prolifération cellulaire au SVZ et à la pénombre ischémique. Ces deux ensembles de données indiquent que le NT-020 accroît la prolifération cellulaire dans le SVZ neurogénique et facilite aussi la migration de nombreuses de ces cellules nouvellement formées vers la pénombre ischémique striée.

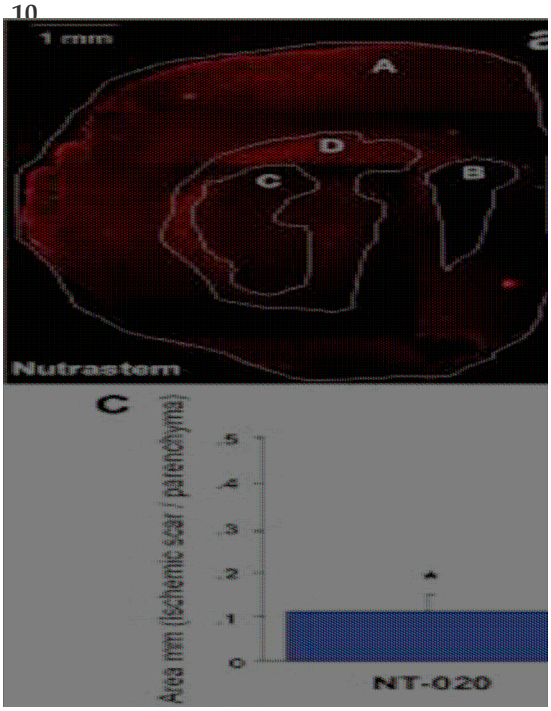


FIG. 3. Marquage au BrdU de cerveaux traités au placebo **(A-C)** et au NT-020 **(D-F)** d'animaux ayant subi un AVC. Le NT-020 augmente le nombre de cellules positives au

BrdU proliférant dans le SVZ (le rectangle en **D**, amplifié en **E**) et dans le striatum ischémique (le cercle en **D**, amplifié en **F**) comparé au traitement avec le placebo (SVZ, le rectangle en **A**, amplifié en **B**; striatum, le cercle en **A**, amplifié en **C**).

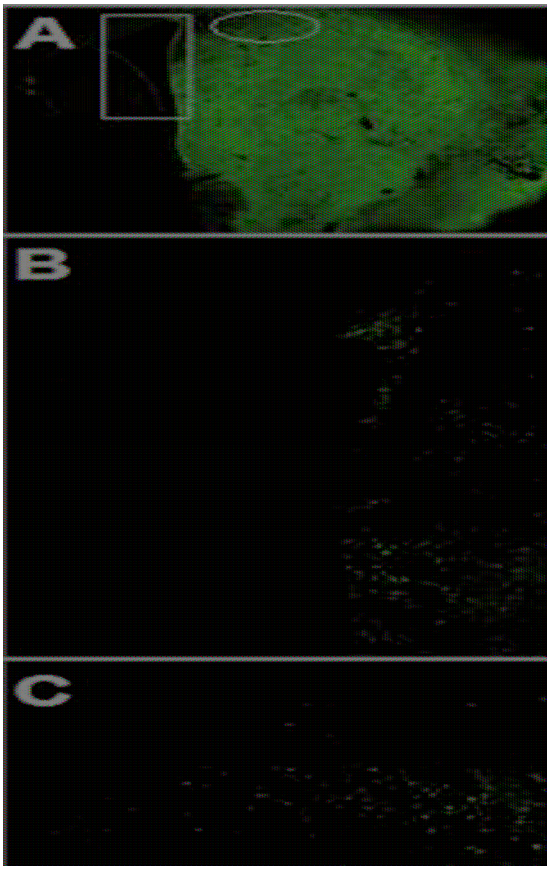
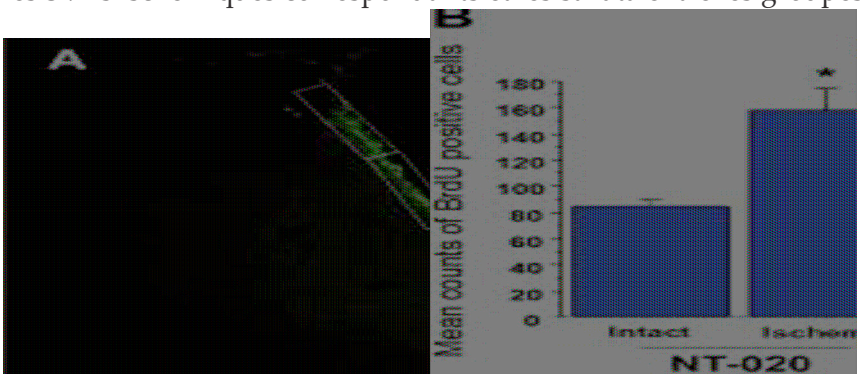
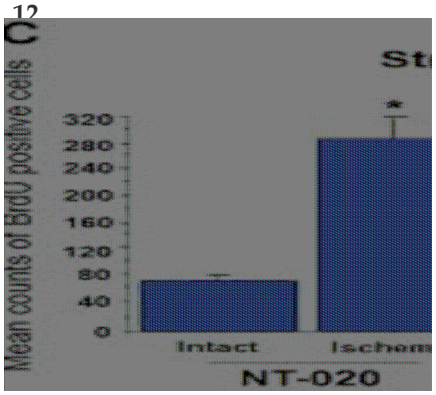


FIG. 4. L'analyse quantitative du marquage au BrdU dans le SVZ **(A)** a suivi le protocole de Baldauf et Reymann.[47] Quatre sections rectangulaires (200 m 60 m) 100 fois amplifiées de deux séries de sections cérébrales de chaque rat ont été utilisées pour révéler le compte moyen des cellules positives au BrdU dans le SVZ. Pour l'analyse quantitative du marquage au BrdU dans le striatum, deux séries de sections cérébrales de chaque rat présentant la pénombre striée montrée en Figure 5A et D (et amplifiée en Fig. 5C et E), avec chaque section correspondant à 40 m 40 m, ont été utilisées pour révéler le compte moyen de cellules positives au BrdU dans le striatum ischémique. Les résultats ont montrés respectivement une augmentation équivalente ou triple dans le SVZ **(B)** et dans le striatum **(C)** pour les cerveaux ayant subis et AVC traités au NT-020 en comparaison avec le traitement au placebo (**p* 0.0005 dans le SVZ et **p* 0.0001 dans le striatum lorsqu'on compare les SVZs ischémiques correspondants et les striata entre les groupes).





Le NT-020 facilite l'expression de phénotypes neuronaux des cellules nouvellement formées

La microscopie en immunofluorescence a révélé un double marquage répandu des cellules au BrdU et au Doublecortin chez les cerveaux ayant subis un AVC et traités au NT-020, tandis que seulement quelques cellules ont été doublement marquées avec le BrdU et le Doublecortin pour ceux traités au placebo (Fig. 5). Une analyse quantitative a révélé autour de 17% et 75% de double marquage au BrdU et au Doublecortin respectivement dans les zones intactes et ischémiques des cerveaux ayant subis un AVC et traités au NT-020, ce qui est significativement plus élevé que les chiffres vus dans les zones intactes (5%) et ischémiques (13%) des cerveaux traités au placebo (*p 0.05, **p 0.0001) (Fig. 6, 7A). En revanche, seulement quelques cellules dans les cerveaux ayant subis un AVC et traités au NT-020 ont présenté un double marquage au BrdU et au GFAP, tandis que plusieurs cellules dans les cerveaux ayant subis un AVC et traités au placebo ont été doublement marquées au BrdU et au GFAP (Fig. 6). Une analyse quantitative a révélé environ 1% et 2% de double marquage au BrdU et au GFAP respectivement dans les zones intactes et ischémiques des cerveaux ayant subis un AVC et traités au NT-020, ce qui est significativement inférieur aux chiffres vus dans les zones intactes (18%) et ischémiques (35%) des cerveaux traités au placebo (**p 0.0001) (Fig. 7B). Ces données indiquent que le NT-020 induit une différentiation neurale, avec une tendance accrue vers une lignée neuronale plutôt que gliale.

Le NT-020 atténue les altérations dans les facteurs neurogéniques conséquentes de l'AVC

L'ELISA d'homogénats de tissu cérébral a révélé que les niveaux de SCF, de GDNF, de BDNF, et de VEGF dans le cortex ischémique et le striatum des animaux traités au placebo ont été significativement réduits à 40-50% des régions cérébrales intactes correspondantes. En revanche, les niveaux de ces mêmes facteurs trophiques dans le cortex ischémique et le striatum des animaux traités au NT-020 ont été maintenus à 70-80% des régions cérébrales intactes correspondantes. Des essais ANOVAs uniques pour chaque facteur trophique ont révélé des différences significatives entre les groupes de traitement

(p 0.0001), et des tests post-hoc ont ensuite confirmé les effets neurogéniques du NT-020 dans le cortex ischémique et le striatum en comparaison avec le traitement placebo (*p 0.05 vs. la région cérébrale correspondante des animaux traités au placebo) (Fig. 8).

FIG. 5. La différentiation neuronale de cellules nouvellement formées dans le striatum ischémique est induite par le NT-020, ce qui est montré par un nombre important de cellules doublement marquées **(F)** au BrdU **(D)** et au Doublecortin **(E)** en comparaison avec le traitement au placebo (**A**, BrdU; **B**, Doublecortin; **C**, confondus).

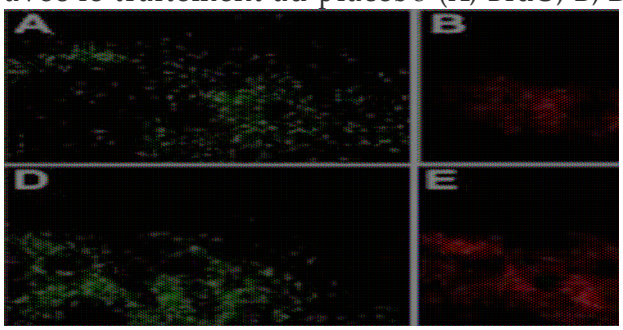


FIG. 6. Le NT-020 n'a pas augmenté la différenciation des cellules nouvellement formées en une lignée gliale dans le striatum ischémique, ainsi qu'il est révélé par un petit nombre de cellules doublement marquées **(F)** au BrdU **(D)** et au GFAP **(E).** Par ailleurs, il y avait plusieurs cellules doublement marquées au BrdU et au GFAP dans le striatum ischémique traité au placebo (**A**, BrdU; **B**, GFAP; **C**, confondus).

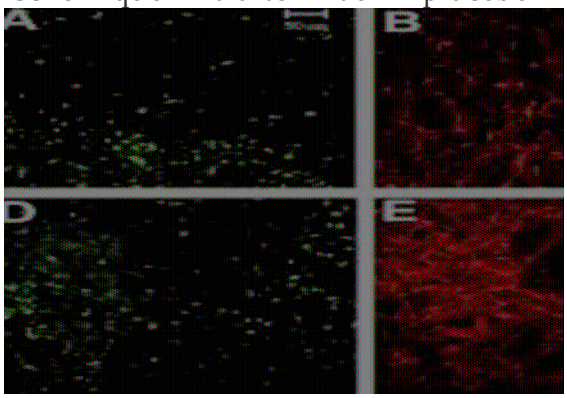
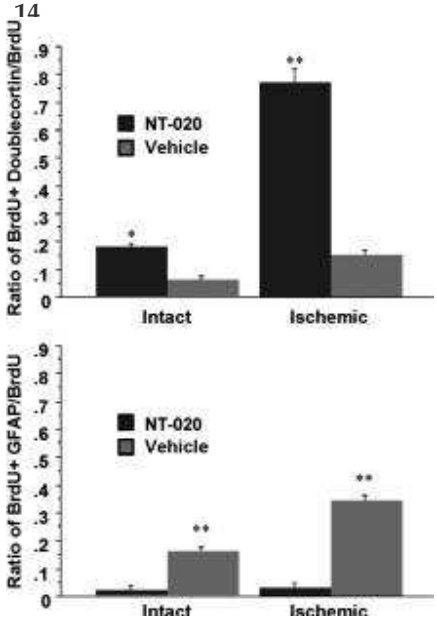


FIG. 7. **(A)** Une analyse quantitative a révélé un double marquage significativement supérieur au BrdU et au Doublecortin pour les cerveaux ayant subis un AVC traités NT-020 que pour ceux traités au placebo (*p 0.05, **p 0.0001). **(B)** D'autre part, il y a eu un double marquage au BrdU et au GFAP significativement moindre dans les cerveaux ayant subis un AVC traités au NT-020 par rapport à ceux traités au placebo (**p 0.0001).



DISCUSSION

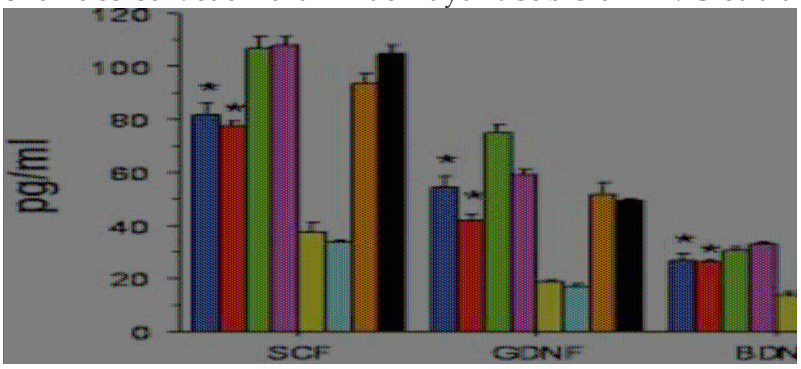
La présente étude démontre les effets neuroprotecteurs incontestables du NT-020 lorsque administré avant un AVC. L'amélioration observée des déficits comportementaux provoqués après un AVC, par le NT-020 ont été accompagnées d'un accroissement de la prolifération cellulaire et d'une différentiation neuronale de cellules nouvellement formées dans le cerveau atteint par l'AVC.

Supplément alimentaire contre les dommages ischémiques

Wang et ses collègues[22] ont récemment démontré les effets neuroprotecteurs de suppléments alimentaires dans l'ischémie focale du cerveau. Dans cette étude, des souris adultes males de l'espèce Sprague-Dawley ont été nourries avec des quantités égales de suppléments (myrtille, épinard ou spiruline) ou avec un régime contrôlé pendant une période de 4 semaines, et ont ensuite été soumises à une chirurgie impliquant une ligature transitoire de l'artère moyenne cérébrale (MCAl). Ce modèle d'AVC MCAl produit un infarctus persistant, de manière prédominante dans le cortex. Des essais comportementaux et histologiques après 24 et 48 h ont révélé que les animaux ayant subi l' AVC et reçu des régimes enrichis en myrtille, en épinards ou en spiruline ont montré une augmentation significative de l'activité locomotrice, ce qui a coïncidé avec une réduction du volume de l'infarctus dans le cortex cérébral. Les analyses des paramètres physiologiques n'ont révélé aucune différence dans la composition biochimique du sang, son niveaux de CO^2 et les niveaux électrolytes entre les groupes, ce qui laisse suggérer que les changements des fonctions physiologiques n'ont pas contribué à la neuroprotection observée. De plus, les animaux ayant subi l'AVC et traités avec de la myrtille,

des épinards ou de la spiruline ont présenté une activité de la caspase-3 significativement inférieure dans l'hémisphère ischémique. Ces données démontrent que les suppléments alimentaires à base de myrtille, d'épinard ou de spiruline ont atténué l'infarctus cérébral provoqué par l'AVC et l'apoptose et plus généralement des handicaps de la locomotion, et des effets neuroprotecteurs similaires et parallèles de l'administration de suppléments alimentaires pour d'autres troubles liés à l'âge, comme l'Alzheimer [37] et la maladie de Parkinson.[38]
Cependant, jusqu' à présent le mécanisme exact sous-jacent de cette neuroprotection reste à être déterminé.

FIG. 8. L'ELISA a montré que le traitement au NT-020 maintient 70-80% des niveaux des facteurs trophiques dans le cortex et striatum ischémique (*p 0.05 vs. Les régions correspondantes chez des cerveaux d'animaux ayant subis un AVC et traités au placebo).



Les Suppléments alimentaires et la neurogenèse

Ici, il est démontré que le NT-020 a facilité une neurogenèse endogène pour le cerveau victime d'un AVC. Le mécanisme sous-jacent d'une telle neurogenèse accrue implique vraisemblablement le NT-020 régulateur d'une myriade de facteurs neurogéniques endogènes, comme le SCF, le BDNF, le GDNF et le VEGF, qui à leurs tour stimulent la naissance de neurones nouveaux dans le cerveau ischémique. Des études précédentes ont impliqué la neurogenèse comme une voie de neuroprotection puissante déclenchée par l'administration de suppléments alimentaires. Par exemple, un supplément à base de myrtille (une des composantes du NT-020) a augmenté à court terme la neurogenèse de l'hippocampe,[39] ce qui pourrait expliquer l' amélioration des fonctions cognitives des animaux âgés traités avec ce régime.[37]
Le paradigme inverse de manipulation alimentaire, concernant la restriction calorique et le jeûne intermittent, a également été démontré qu'il protège contre un AVC.[5,10,11] Dans ces études, les rongeurs maintenus sous un régime de restriction calorique ou soumis à jeûne de façon intermittente ont développé une résistance accrue des cellules cérébrales pour des modèles expérimentaux d'AVC. Des mécanismes de postulat qui sous-tendent la neuroprotection résultante du régime restrictif incluent un stress oxydant diminué et une résistance cellulaire accrue face à ce stress, ce qui peut, seul ou combiné, promouvoir un état « préconditionné », en amorçant le cerveau à résister à une agression tel qu'AVC. De plus, une régulation des

facteurs neurotrophiques (i.e., des niveaux plus élevés de BDNF) des voies de signalisation a été observée.[11] Par ailleurs, ces auteurs ont noté que la restriction alimentaire peut stimuler la neurogenèse et augmenter la plasticité synaptique.[10,40] Clairement, les études réalisées par Mattson et ses collègues [5,10,11,40] indiquent qu'un régime réduit d'ingestion de nourriture exerce une neuroprotection contre l'AVC.

Ces rapports anciens et nos données actuelles, lorsque considérés ensemble, soutiennent notre hypothèse générale que la manipulation alimentaire, soit en restreignant l'ingestion calorique trop élevé ou via l'administration de suppléments nutritifs d'extraits/composés, apparaît comme une thérapie d'adjonction efficace pour l' AVC. La présente étude a fourni des évidences directes que la neurogenèse, impliquée comme un mécanisme sous-jacent des effets neuroprotecteurs d'une restriction alimentaire,[40] joue similairement un rôle majeur pour les bénéfices fonctionnels des suppléments alimentaires. En vue de la manifestation pathologique de l'AVC, au moins dans ce modèle de MCAo , caractérisé par une perte neuronale extensive accompagnée d'une activation des cellules gliales accrue, il semble que le remplacement neuronal sera plus avantagé que le réapprovisionnement des cellules gliales. L'importante différentiation neuronale à la deuxième semaines post-AVC est également bénéfique puisqu'une mort cellulaire rapide en cascade intervient après le déclenchement de l'AVC. Ainsi, la différentiation neuronale préférentielle des cellules nouvellement formées dans le cerveau ischémique fourni un solide moyen mécanique au NT-020 pour produire une neuroprotection contre l' AVC.

Régime nutritif et stress oxydant

Une voie également importante pour la neuroprotection à travers un régime nutritif est la suppression du stress oxydant. En effet, un volume important d' évidences expérimentales impliquent les effets antioxydants et chélateurs importants du polyphénol [20] des myrtilles,[12,13] du thé vert,[14,15] de la vitamine D3,[16,17] et de la carnosine.[18,19] Ces caractères antioxydants d' extraits nutritifs, considérés avec le potentiel neurogénique observé, font que ces composés soient attractifs dans la catégorie des agents neuroprotecteurs avec des cibles multiples pour arrêter les apoptoses en cascade. Cependant, une controverse permanente porte sur la capacité de ces composés à traverser la barrière du sang cérébral (BBB) et de permettre l'activation de ses effets dans le CNS. Dans le cerveau malade, comme dans celui atteint par l'AVC dans le cas présenté, cette barrière BBB a été compromise,[41,42] ce qui pourrait faciliter l'entrée de ces composés dans le cerveau. Alternativement, les développements de petites molécules dérivées de ces composés nutritifs qui pourraient facilement s'infiltrer à travers la barrière BBB devraient améliorer la biodisponibilité du CNS et les bénéfices thérapeutiques du NT-020.

Vers un régime nutritif composé d' agents multiples pour l' AVC

Des études récentes ont démontré que certains des agents utilisés dans la présente étude sont neuroprotecteurs contre l'AVC[22,43–46] et que la myrtille conduit à l'augmentation de la neurogenèse.[39] Sur la base de ces publications récentes sous le thème central d' extraits de plantes (spécifiquement de myrtille) et de la neuroprotection, la présente étude, à première vue, semble manquer de nouveauté. Malgré ces récentes publications avec des observations qui coïncident avec notre étude, les rapports à ce jour sur les agents nutritifs qui impliquent leurs effets neuroprotecteurs contre l'AVC ont utilisé seulement un agent thérapeutique. En conséquence, pour un tel régime de traitement à agent unique pour aboutir à un résultat thérapeutique, le dosage de chaque agent est évidemment plus élevé que le régime présent à base d'une combinaison de plusieurs agents. Nous souhaitons promouvoir la notion que ce dosage d'agent est crucial pour des fins pratiques, spécialement lorsque l'on aménage ce traitement potentiel à l'espace clinique. Pour accomplir la neuroprotection contre l'AVC avec un régime à base d'un agent unique comme traitement, le patient doit recevoir des doses élevées de chaque agent. Cependant, pour que la combinaison en agents multiples offre une neuroprotection, la présente étude propose un dosage des agents modeste et tolérable (i.e., au moins 20 fois moins que celui requis pour le régime à agent unique[21,22]). En combinaison avec ces nouvelles informations médicales, les résultats présents fournissent une avancée considérable dans la scène scientifique et clinique en démontrant l'avantage de plusieurs agents sur un régime à agent unique. De plus, un examen attentif de l'étude publiée sur le rôle de la myrtille sur la neurogenèse[39] révèle que le traitement à la myrtille (encore une fois comme agent unique) chez les animaux âgés, a augmenté la plasticité neuronale de l'hippocampe, ce qui est en corrélation avec des améliorations dans la mémoire spatiale. Bien que des redondances et des conditions pathologiques qui se chevauchent existent pour les voies de vieillissement et mort cellulaire par AVC, des investigations sur les troubles spécifiquement humains (dans notre cas, l'AVC) sont nécessaires soit pour supporter ou nier le potentiel neurogénique de la myrtille. Ainsi, la présente étude fourni la première preuve directe du potentiel neurogénique d'un régime nutritif (myrtille inclue) pour les animaux ayant subis un AVC, ce qui coïncide avec le mécanisme neuroprotecteur de tels composés vus chez les animaux âgés.

CONCLUSIONS

Les présents résultats mettent en valeur les bénéfices fonctionnels de suppléments alimentaires en augmentant la neurogenèse dans le cerveau adulte atteint par l'AVC. Le résultat amélioré chez les animaux ayant subis un AVC et soumis à l'administration de

suppléments alimentaires complète le paradigme de la restriction alimentaire[5,10,11,40] comme une stratégie neuroprotectrice. Par ailleurs, nous avons identifié que la neurogenèse endogène accompagne de près l'administration de suppléments alimentaires, comme cela est observable avec la restriction alimentaire, et fait avancer ainsi le concept d'augmenter le potentiel neurogénique du cerveau endommagé comme une stratégie puissante dans la promotion de la neuroprotection contre l'AVC.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les études pilotes des Drs. R.D. Shytle et J. Tan pour la formulation du NT-020. PCB et PRS sont co-fondateurs de Natura Therapeutics, Inc., et CVB est un consultant.