



HAL
open science

Validation fonctionnelle d'approches nutritionnelles à allégation "Bien vieillir", capables de prévenir le vieillissement cérébral et les maladies neurodégénératives

Ahmad Allouche

► **To cite this version:**

Ahmad Allouche. Validation fonctionnelle d'approches nutritionnelles à allégation "Bien vieillir", capables de prévenir le vieillissement cérébral et les maladies neurodégénératives. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0316 . tel-01749476

HAL Id: tel-01749476

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749476v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE D'AGRONOMIE

ET D'INDUSTRIES ALIMENTAIRES

École doctorale « Ressources, Procédés, Produits, Environnement »

Thèse

préparée par

M. Ahmad ALLOUCHE

Laboratoire Lipidomix (EA4422), ENSAIA

sur le sujet

**VALIDATION FONCTIONNELLE D'APPROCHES NUTRITIONNELLES
À ALLÉGATION « BIEN VIEILLIR »,
CAPABLES DE PRÉVENIR LE VIEILLISSEMENT CÉRÉBRAL
ET LES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES**

pour l'obtention du titre de Docteur en Sciences

Spécialité « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »

Thèse soutenue publiquement à Nancy, Université de Lorraine, le 13 décembre 2012,
devant le jury composé de :

Rapporteurs

- . **Mme Bernadette ALLINQUANT**, Directrice de recherche à l'INSERM, Paris
- . **M. Mustapha CHERKAOUI-MALKI**, Professeur à l'Université de Bourgogne, Dijon

Membres du jury

- . **M. Paul HEUSCHLING**, Professeur à l'Université de Luxembourg (L)
- . **M. Michel FICK**, Professeur à l'Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy
- . **Mme Amélie DHAUSSY**, Ingénieure Agronome, Société Lesieur SAS, Asnières-sur-Seine
- . **M. Thierry OSTER**, Maître de conférences HDR à l'Université de Lorraine

À mon espoir Imane,

Un rayon de soleil qui illumine ma vie un peu plus chaque jour !

À mon petit prince ... Omar !

À toute ma famille et mes amis !

REMERCIEMENTS

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

Et c'est avec beaucoup d'émotion que je tiens à présenter ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, Dr Thierry OSTER, maître de conférences HDR à l'Université de Lorraine, qui m'a apporté énormément sur le plan scientifique et sur le plan humain. Les mots me manquent vraiment pour t'exprimer mon immense reconnaissance et il est irréaliste de penser que quelques lignes suffiront ! Merci Thierry de m'avoir encadré, accordé tant de temps et donné des idées constructives et si précieux conseils. Tu as toujours été juste et encourageant, et si je sors aujourd'hui grandi de cette expérience, c'est principalement grâce à toi.

J'aimerais remercier aussi les Dr Frances YEN-POTIN et Thierry PILLOT, directeurs du laboratoire LIPIDOMIX (Lipides et Neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer, EA 4422), qui m'ont ouvert les portes de leur laboratoire pour m'initier au monde merveilleux de la recherche, un univers complexe mais très passionnant. Ils m'ont permis de vivre une expérience très enrichissante, même si tout n'a pas toujours été facile. Je voudrais leur adresser ma plus profonde reconnaissance et leur dire toute mon admiration pour leurs valeurs tant humaines que professionnelles.

J'adresse mes vifs remerciements au Dr Bernadette ALLINQUANT et au Pr. Mustapha CHERKAOUI MALKI pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je les remercie pour le temps qu'ils ont consacré pour juger ce travail et pour l'honneur qu'ils me font d'évaluer ce travail. Je remercie aussi le Pr. Paul HEUSCHLING et Mme Amélie DHAUSSY pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur. Je tiens à vous exprimer ma respectueuse considération et ma sincère gratitude. Votre examen de cette thèse et des travaux qui y sont présentés sera un privilège.

Je souhaite également remercier sincèrement le Pr. Michel FICK, le directeur de l'ENSAIA, pour deux raisons essentielles : m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer au jury de ma thèse, et surtout pour son aide précieuse. C'est grâce à lui et au Pr. François LAURENT, le président de l'INPL, que j'ai pu poursuivre mes études supérieures en France et découvrir la culture française.

Je souhaite adresser un chaleureux remerciement au Ministère de l'Enseignement Supérieur de la République Arabe Syrienne et à l'Université de Damas pour leur soutien financier. Je tiens également à remercier tous les membres du département de biologie animale à l'Université de Damas, tout particulièrement les Dr Moustapha BASSAL et Georges DIB pour leur soutien indéfectible et leurs conseils et encouragements tout au long de ma thèse.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du laboratoire LIPIDOMIX que j'ai eu l'honneur de rencontrer au cours de cette thèse, particulièrement les Dr Catherine MALAPLATE-ARMAND, Marie-Claire LANHERS et Lynn PAURON, ainsi que les Pr. Jean Luc OLIVIER et Catherine CORBIER pour leurs encouragements, leurs conseils, et nos échanges scientifiques qui m'ont largement inspiré et m'inspireront encore.

Un très grand merci à Violette KOZIEL qui m'a enseigné les différentes techniques et m'a donné de précieux conseils, notamment pour la culture primaire. Je te remercie pour ta gentillesse, ton soutien, ta bonté, ta patience et ta sincérité. Un grand merci aussi à Marie-Christine ESCANYÉ du service de biochimie de l'hôpital central (CHRU Nancy), pour la qualité de ses analyses sur les acides gras et le glutathion.

Un merci tout spécial aussi au Dr Ihsen YOUSSEF pour sa précieuse contribution à ce travail en réalisant les très nombreuses injections intracrâniennes. Il me tient très sincèrement à remercier de tout mon cœur les anciens et nouveaux membres du laboratoire pour les merveilleux moments passés ensemble, tout particulièrement Laurent, Nicolas, Dorine, Annabelle, Sophie, Mélanie, Lyse, Julie, Anthony, Hamed, Samina, Nazir, Cédric, Marine, Christophe, Pierre et Delphine. Merci à tous pour votre bonne humeur, même dans les moments difficiles. Cette thèse n'aurait pas été une si belle aventure sans vous. Ces quelques années sont pour moi inoubliables.

Je n'oublie pas de remercier le Dr Sabrina FLORENT-BÉCHARD qui m'a énormément aidé, par son expérience, sa disponibilité et son enthousiasme, dans les premiers pas de la vie d'un jeune chercheur et ensuite pendant ma première année de thèse. C'est toujours agréable et un vrai plaisir de travailler avec toi, Sabrina !

Merci également à Ève CADORET qui m'a beaucoup aidé à maîtriser la langue française !

Cette thèse n'aurait jamais été la même sans le soutien de ma famille. Je pense très particulièrement à mes Parents pour leur amour, leur soutien et pour tout ce qu'ils ont fait pour moi. Ce travail représente peu, comparé aux lourds sacrifices que vous avez consentis pour moi. Je vous en serais éternellement redevable. Votre absence à ma soutenance me manquera. Je n'oublie pas également mes frères et sœurs.

Je tiens à remercier ma belle famille qui a toujours été présente lorsque j'en ai eu besoin (malgré la distance). Merci Saïd, Fatinah et Sami pour vos encouragements, votre soutien et votre amour durant tout ce temps. Vous êtes beaucoup plus qu'une belle famille !

J'adresse mes remerciements à toute la famille un peu plus éloignée, oncles, tantes, cousins et cousines, avec une dédicace particulière à Nabile, Ayman, Mahmoud, et Osama. Je tiens également à remercier chaleureusement mes nombreux amis !

Imane, si ces années d'études ont été aussi plaisantes, c'est sans aucun doute grâce à toi. Ton réconfort, ton soutien et ton amour apaisent tous mes maux. Tu es pour moi une source continue d'inspiration, de sagesse et d'amour. Chaque jour, tu m'aides à être meilleur et je ne serai pas là où j'en suis sans toi...

Merci du fond du cœur d'avoir accepté avec sourire les rentrées tardives ou les passages au labo le week-end, et merci d'avoir soigneusement relu ce manuscrit. La poursuite de ma carrière nous emmènera sous d'autres cieux, mais avec toi, seul le bonheur est à attendre.

Aujourd'hui, avec la présence de notre petit prince Omar, nous nous laissons emporter dans une nouvelle aventure qui sera pleine de joie et d'amour. Je t'aime,

Enfin, merci à tous ceux que je n'ai pas cités et qui pourtant devraient être ici aussi...

TABLE DES MATIÈRES

	<i>Page</i>
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIÈRES	9
LISTE DES ILLUSTRATIONS	15
ABRÉVIATIONS	19
AVANT-PROPOS	21
INTRODUCTION GÉNÉRALE	23
SITUATION DU SUJET	25
A. Vieillessement cérébral normal ou pathologique	25
1. Définition et aspects biologiques	25
a. Les hypothèses génétiques.....	28
i. La théorie génétique.....	28
ii. La théorie de l'horloge biologique.....	29
b. Les hypothèses stochastiques (aléatoires).....	29
i. La théorie des radicaux libres (théorie mitochondriale).....	29
ii. La théorie de la glycation non enzymatique des protéines (cross-linking).....	30
iii. La théorie de la restriction énergétique (restriction diététique).....	31
2. Maladies liées au vieillissement.....	31
a. Le diabète insulino-résistant.....	31
b. Les cancers.....	32
c. Les maladies cardiovasculaires.....	33
d. Les maladies neurodégénératives.....	34
i. La maladie d'Alzheimer.....	34
ii. La maladie de Parkinson	34
3. Facteurs de risque de vieillissement pathologique.....	35
a. Facteurs environnementaux : exposition à des toxiques.....	35
b. Alimentation et habitudes de vie	37
c. Stress oxydant.....	37
d. Traumatismes crâniens	41
e. Facteurs socio-économiques.....	42
f. Réserve cognitive : stimulation intellectuelle / niveau d'études	43
g. Activités physiques	45
4. Effets du vieillissement.....	47
a. Sur le métabolisme	47
i. Effets du vieillissement sur le métabolisme protéique	47
i. Effets du vieillissement sur le métabolisme lipidique	48
ii. Effets du vieillissement sur le métabolisme glucidique	48
b. Sur le système nerveux central.....	49
c. Sur le système cardiovasculaire.....	52
i. Effets du vieillissement sur le cœur	52

ii. Effets du vieillissement sur les vaisseaux.....	52
5. Vers un vieillissement réussi.....	53
B. La maladie d'Alzheimer	55
1. La maladie d'Alzheimer : un siècle déjà.....	55
2. Prévalence, incidence et impact socio-économique	56
3. Stades cliniques.....	57
4. Éléments de diagnostic	59
a. Caractérisation post mortem des lésions microscopiques	59
i. Les neurodégénéscences neurofibrillaires.....	59
ii. La protéine Tau et son implication dans les neurofibrilles.....	60
iii. Lésions amyloïdes.....	62
b. Diagnostic clinique	63
i. Évaluation neuropsychologique.....	63
ii. Imagerie médicale.....	65
iii. Marqueurs biologiques.....	65
5. La protéine APP, précurseur du peptide amyloïde	66
a. Implication des sécrétases dans le clivage de la protéine APP.....	69
b. Localisation et fonction de la protéine APP et de ses dérivés	71
6. Les oligomères solubles de peptide A β	73
7. La toxicité des A β Os	74
a. Mécanismes de toxicité induits par les A β Os.....	75
i. Réponse inflammatoire et conséquences neurodégénératives	75
ii. Stress oxydant	76
iii. Synaptotoxicité.....	77
b. Processus de fibrillogénèse.....	77
8. Dégradation du peptide A β	78
9. Causes et facteurs de risques de la MA	80
a. Formes familiales de la MA	80
b. Formes sporadiques de la MA	80
c. Facteurs de risques	81
i. Les facteurs de risque non modifiables	81
ii. Les facteurs de risque modifiables.....	82
10. Modèles animaux de la MA.....	87
a. Les modèles animaux transgéniques.....	87
b. Les modèles d'injection intracérébrale du peptide A β	88
C. Vers une approche nutritionnelle préventive du vieillissement pathologique	89
1. Le cholestérol, un facteur de risque	89
a. Synthèse et métabolisme du cholestérol	89
i. Synthèse.....	90
ii. Transport, stockage et élimination	91
b. Localisation et trafic du cholestérol cellulaire	91
c. Cholestérol cérébral et susceptibilité à la MA.....	92
d. Taux de cholestérol chez les patients atteints de la MA.....	92
i. Dans le plasma sanguin	92
ii. Dans le cerveau	93

e. Modulation des taux de cholestérol : impact sur la MA	93
i. Méthyl- β -cyclodextrine	93
ii. Statines.....	94
iii. Acylcoenzyme A cholestérol acyltransférase (ACAT).....	94
iv. Cholestérol 24-hydroxylase.....	94
2. Les acides gras polyinsaturés de la série <i>n</i> -3, des acides gras protecteurs	94
a. Caractéristiques structurales	95
b. Sources des AGPI	97
c. Recommandations pour l'apport en AGPI <i>n</i> -3.....	99
d. Biodisponibilité des acides gras	99
i. Absorption intestinale.....	99
ii. Distribution tissulaire.....	101
iii. Biodisponibilité.....	101
e. AGPI <i>n</i> -3 et cerveau : du normal au pathologique.....	104
i. AGPI à longue chaîne dans le cerveau.....	104
ii. Modulation de la composition cérébrale en DHA par le régime alimentaire	108
iii. Composition cérébrale en AG au cours du vieillissement normal ou pathologique	109
f. AGPI <i>n</i> -3 et protection contre le stress amyloïde et la MA	110
i. Propriétés anti-amyloïdogènes et promotion de la survie cellulaire.....	110
ii. Régulation de la plasticité synaptique et de la neurogenèse.....	112
iii. Propriétés cardiovasculaires	113
iv. Propriétés anti-inflammatoires	114
v. Propriétés antioxydantes	116
vi. Régulation génique de la neuroinflammation et de la plasticité synaptique	117
vii. Contrôle de l'utilisation cérébrale du glucose.....	121
g. AGPI <i>n</i> -3 et déclin cognitif: études épidémiologiques	122
i. Statut sanguin en AGPI <i>n</i> -3.....	122
ii. Consommation alimentaire en AGPI <i>n</i> -3 et déclin cognitif.....	123
3. Les polyphénols, des molécules naturelles d'intérêt thérapeutique	125
a. Définitions	125
b. Structure et classification	126
i. Les non flavonoïdes (acides phénoliques)	126
ii. Les flavonoïdes	128
c. Biodisponibilité	128
i. Métabolites circulants.....	129
ii. Concentrations plasmatiques.....	130
iii. Distribution dans les tissus et organes	130
iv. Voies d'élimination.....	130
d. Propriétés biologiques.....	131
i. Propriétés antioxydantes.....	131
ii. Mécanisme d'action des flavonoïdes contre les ERO.....	131
iii. Propriétés anti-inflammatoires	134
iv. Propriétés anti-apoptotiques	135
v. Propriétés anti-amyloïdes	135
vi. Propriétés neuroprotectrices	137
vii. Propriétés neurotrophiques.....	139
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU TRAVAIL	141
PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES.....	145
A. Préparation des peptides	145
B. Animaux et conditions d'hébergement.....	145

C. Chirurgie stéréotaxique	145
1. Anesthésie.....	145
2. Injection intracérébrale	145
D. Analyses comportementales.....	146
1. Système de capture vidéo	146
2. Procédure standard d'évaluation des mémoires à court et à long terme	147
a. Étude de la mémoire spatiale à court terme.....	147
b. Étude de la mémoire spatiale à long terme	148
E. Mesure de la masse grasse	149
F. Échantillonnage	149
1. Dissections et prélèvements tissulaires	149
2. Préparation des synaptosomes.....	150
G. Prélèvements sanguins.....	150
H. Analyses biochimiques	150
1. Dosage des protéines	150
2. Immunoblot	150
a. Électrophorèse.....	150
b. Électrotransfert	151
c. Immunorévélation des protéines.....	151
3. Extraction des lipides cérébraux	151
4. Dosage des acides gras	151
5. Dosages biochimiques et immunochimiques.....	152
a. Glucose.....	152
b. Triglycérides.....	152
c. Cholestérol total	153
d. Cholestérol-HDL.....	153
e. Isoformes d'A β et marqueurs inflammatoires IL6 et TNF α	154
I. Dosage du glutathion sanguin.....	154
J. Cultures primaires de neurones corticaux embryonnaires de rat	155
K. Traitements des neurones en culture primaire	156
1. Traitements par le DHA	156
2. Traitements par les oligomères A β solubles.....	157
L. Test d'activité mitochondriale au MTT	158
1. Principe	158
2. Protocole expérimental	158
M. Analyses statistiques	158
RÉSULTATS ET DISCUSSION	159
A. La supplémentation alimentaire en DHA protège contre le déclin cognitif et préserve les synapses chez les souris modèles de la maladie d'Alzheimer	159
1. Introduction	159
2. Effets induits par le DHA alimentaire sur la cognition et l'intégrité synaptique chez la souris	160
a. Composition des régimes alimentaires	160
b. Paramètres biologiques (prise alimentaire, poids corporel).....	161

c. Paramètres plasmatiques (cholestérol, triglycérides, glucose)	163
d. Devenir des AGPI-LC <i>n</i> -3 et compositions érythrocytaires en acides gras	163
e. Stress amyloïde et capacités cognitives	164
f. Analyses biochimiques des structures cérébrales	168
i. Acides gras cérébraux.....	168
ii. Protéines synaptiques cérébrales.....	171
3. Étude préliminaire d'une association entre le DHA et l'alcool vanillique.....	177
a. Structure et propriétés neuroprotectrices et antioxydantes	178
b. Neuroprotection par l'ester vanillique de DHA contre le peptide A β	179
4. Conclusions	184
B. Prévenir la dyslipidémie par le DHA peut protéger contre le vieillissement et les pathologies associées (maladies cardiovasculaires, déclin cognitif, maladie d'Alzheimer).....	187
1. Introduction	187
2. Modèle d'étude et régimes administrés.....	189
3. Paramètres biologiques (prise alimentaire, poids corporel, masse grasse)	192
4. Paramètres métaboliques (cholestérol, triglycérides, glucose)	205
a. Cholestérolémie.....	205
b. Triglycéridémie.....	210
c. Glycémie.....	212
5. Compositions érythrocytaires en acides gras	214
6. Marqueurs sanguins de processus inflammatoires et pro-oxydants	222
7. Comportement et cognition.....	225
8. Stress amyloïde et capacités cognitives.....	231
a. Mémoire à court terme.....	232
b. Apprentissage.....	236
c. Mémoire à long terme.....	239
9. Analyses biochimiques des structures cérébrales	242
a. Acides gras cérébraux	243
b. Protéines synaptiques cérébrales.....	246
10. Conclusions	252
CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES	255
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	259
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	289
RÉSUMÉ - ABSTRACT	291

LISTE DES ILLUSTRATIONS

	<i>Page</i>
Figure 1 : Augmentation du nombre de publications parues depuis 1985	26
Figure 2 : Représentation des trois modes de vieillissement fonctionnel	26
Figure 3 : Évolution du diabète dans les pays industrialisés et en voie de développement.....	32
Figure 4 : Causes de l'augmentation de l'incidence du cancer	32
Figure 5 : Prévalence des maladies cardiovasculaires chez les adultes selon l'âge et le sexe	33
Tableau 1 : Incidence de l'infarctus du myocarde	34
Tableau 2 : Prévalence de la maladie de Parkinson en France et aux États-Unis	35
Figure 6 : Formule chimique de base des PCB	36
Figure 7 : Principales étapes du métabolisme mitochondrial des ERO.....	39
Figure 8 : Évolution de l'oxydation des protéines du cerveau chez l'homme	41
Figure 9 : Influence de la classe sociale sur la santé physique et mentale au cours du vieillissement	43
Figure 10 : Hypothèses de la formation de réserve cognitive	44
Tableau 3 : Modification de la composition corporelle au cours du vieillissement chez l'homme.....	47
Figure 11 : Hypothèse « <i>last in, first out</i> » du vieillissement du cortex.....	50
Figure 12 : Épines dendritiques des neurones corticaux de primates non humains jeunes et âgés	51
Figure 13 : Modèle d'évolution de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.....	58
Figure 14 : Progression des symptômes de la maladie d'Alzheimer	58
Figure 15 : Plaques amyloïdes et dégénérescences neurofibrillaires, marqueurs histopathologiques de la MA.....	60
Figure 16 : Protéine tau & tauopathie	61
Figure 17 : Extension des dépôts amyloïdes	62
Figure 18 : Phases d'évolution des dépôts de peptide A β	62
Figure 19 : Analyse par TEP de la progression des dépôts de peptides A β	65
Figure 20 : Représentation schématique de l'APP695 humaine.....	67
Figure 21 : Schéma de l'action des sécrétases.....	68
Figure 22 : Représentation schématique du complexe γ -sécrétase	71
Figure 23 : Trafic intracellulaire de la protéine APP	71
Figure 24 : Mécanismes d'interaction d'A β O _s avec la membrane neuronale	74
Figure 25 : Cascade de signalisation pro-apoptotique induite par les oligomères d'A β	76
Figure 26 : Processus de fibrillogénèse et formation des plaques séniles	78
Tableau 4 : Modèles d'injection de peptide A β soluble chez le rat	88
Tableau 5 : Modèles d'injection de peptide A β soluble chez la souris.....	89
Figure 27 : Représentation du cholestérol en structure plane.....	90
Figure 28 : Voie de synthèse du cholestérol.....	90
Figure 29 : Métabolisme, transport et internalisation du cholestérol dans le SNC	92
Tableau 6 : Principaux acides gras saturés présents dans les molécules biologiques	95
Tableau 7 : Principaux acides gras mono et polyinsaturés présents dans les composés biologiques	96
Figure 30 : Les esters d'acides gras.....	97
Figure 31 : Voies de biosynthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne.....	98
Figure 32 : Digestion et absorption des lipides alimentaires.....	100

Figure 33 : Proportions des acides gras dans les tissus humains d'adultes sous régime occidental	102
Figure 34 : Représentation de l'acide docosahexaénoïque.....	106
Figure 35 : Représentation schématique d'un radeau lipidique	107
Figure 36 : Voies de synthèse des eicosanoïdes et des docosanoïdes issues des AGPI-lc	115
Figure 37 : Modulation de l'expression des gènes par les AGPI <i>n</i> -3	119
Figure 38 : Classification des polyphénols	127
Figure 39 : Principales classes de l'acide phénolique.....	127
Figure 40 : Structure de base des flavonoïdes	128
Figure 41 : Schéma général du métabolisme des polyphénols	129
Figure 42 : Piégeage des espèces radicalaires par les composés phénoliques	132
Figure 43 : Propriétés structurales associées à une activité antioxydante maximale des flavonoïdes.....	132
Figure 44 : Sites de chélation des ions métalliques sur la quercétine	133
Figure 45 : Inhibition de la formation des fibrilles A β par l'EGCG.....	137
Figure 46 : Propriétés anti-amyloïdes des polyphénols	137
Figure 47 : Capture d'écran du logiciel de capture vidéo.....	147
Figure 48 : Schéma du labyrinthe en Y pour l'évaluation de la mémoire à court terme.....	147
Figure 49 : Schéma du dispositif d'évaluation de la mémoire à long terme	148
Tableau 8 : Composition des différents milieux utilisés pour la culture primaire des neurones.....	155
Figure 50 : Évaluation <i>in vitro</i> du potentiel neuroprotecteur du DHA	156
Figure 51 : Programme nutritionnel de l'étude et suivi des souris.....	161
Figure 52 : Composition des régimes alimentaires	161
Figure 53 : Évolution de la masse corporelle durant le programme nutritionnel.....	162
Figure 54 : Bilans plasmatiques avant et à l'issue du régime alimentaire.....	163
Figure 56 : Évolution des taux de DHA, des ratios ARA/DHA et <i>n</i> -6/ <i>n</i> -3 érythrocytaires selon le régime	164
Figure 57 : Évolution des teneurs érythrocytaires en AGMI et AGS selon le régime	164
Figure 58 : Scénario d'évaluation des capacités cognitives	165
Figure 59 : Protection de la mémoire à court terme par le DHA	165
Figure 60 : Préservation de l'apprentissage et de la mémoire spatiale par le DHA.....	166
Figure 61 : Protection de la mémoire à long terme par le DHA	167
Figure 62 : Influence des régimes sur les teneurs en AGPI dans différentes structures cérébrales	169
Figure 63 : Influence des régimes sur les teneurs cérébrales en AGMI et AGS.....	169
Figure 64 : Relations entre DHA hippocampique et capacités mnésiques.....	170
Figure 65 : Corrélations entre les teneurs en AGPI érythrocytaires et cérébraux	171
Figure 66 : Effet du régime et du traitement sur les protéines synaptiques du cortex frontal	172
Figure 67 : Effet du régime et du traitement sur les protéines synaptiques hippocampique.....	173
Figure 68 : Préservation des récepteurs à tyrosine kinase hippocampiques.....	174
Figure 69 : Corrélations entre les marqueurs synaptiques hippocampiques	175
Figure 70 : Corrélations entre marqueurs synaptiques de l'hippocampe et capacités mnésiques	175
Figure 71 : Corrélations entre TrkB et marqueurs synaptiques hippocampiques ou capacités d'apprentissage	175
Figure 72 : Corrélations entre marqueurs synaptiques du cortex frontal et mémoire à court terme.....	176
Figure 73 : Influence des régimes sur les ratios d'AGPI <i>n</i> -6/ <i>n</i> -3 érythrocytaire et cérébraux.....	177
Figure 74 : Structure chimique de l'alcool vanillique.....	178
Figure 75 : Réaction de synthèse enzymatique de l'ester vanillique de DHA.....	180

Figure 76 : Étude de la toxicité de l'ester DHA-VE sur les neurones corticaux en culture primaire	180
Figure 77 : Viabilité des neurones primaires cultivés dans les milieux conditionnés des cellules HEK293	181
Figure 78 : Effets protecteurs de l'ester DHA-VE vis-à-vis de la neurotoxicité du peptide A β	182
Figure 79 : Effets protecteurs de l'ester DHA-VE sur la culture de neurones primaires	183
Figure 80 : Influence des régimes enrichis en esters de DHA sur les teneurs érythrocytaires en AGPI.....	184
Figure 81 : Programme nutritionnel de l'étude et suivi des souris.....	190
Tableau 9 : Composition des régimes administrés.....	190
Tableau 10 : Teneurs en acides gras dans les régimes et les huiles	192
Figure 82 : Suivi alimentaire durant le programme nutritionnel.....	193
Figure 83 : Consommation quotidienne moyenne selon les régimes	194
Figure 84 : Apport énergétique quotidien moyen selon les régimes	194
Tableau 11 : Évolution de la masse corporelle des souris (ANOVA à 2 facteurs).....	195
Figure 85 : Évolution de la masse corporelle durant le programme nutritionnel.....	196
Figure 86 : Évolution de la variation de la masse corporelle selon les régimes.....	196
Figure 87 : Variations de la masse corporelle selon le régime et la période	197
Figure 88 : Évolution détaillée de la variation de la masse corporelle selon les régimes.....	198
Tableau 12 : Corrélation entre l'apport énergétique et la masse corporelle des souris.....	200
Figure 89 : Évolution détaillée de la variation de la masse corporelle des souris F et G	200
Tableau 13 : Évolution de la masse grasse des souris (ANOVA à 2 facteurs)	201
Figure 90 : Effets des régimes sur l'évolution de la masse grasse des souris	202
Figure 91 : Effets des régimes sur l'évolution de la masse grasse des souris	202
Figure 92 : Évolution de la masse grasse durant le programme nutritionnel	203
Figure 93 : Variations de la masse grasse selon le régime et la période.....	203
Tableau 14 : Évolution de la masse grasse et paramètres corrélés.....	204
Figure 94 : Influence de l'apport énergétique sur la masse grasse des souris	204
Tableau 15 : Évolution de la cholestérolémie (ANOVA à 2 facteurs)	205
Figure 95 : Évolution de la cholestérolémie durant le programme nutritionnel	206
Figure 96 : Variations de la cholestérolémie selon le régime et la période	206
Figure 97 : Distribution du cholestérol au terme du programme nutritionnel.....	208
Figure 98 : Distribution du cholestérol au terme du programme nutritionnel.....	209
Tableau 16 : Évolution de la triglycéridémie (ANOVA à 2 facteurs)	210
Figure 99 : Évolution de la triglycéridémie durant le programme nutritionnel	210
Figure 100 : Variations de la triglycéridémie selon le régime et la période.....	211
Tableau 17 : Évolution de la glycémie (ANOVA à 2 facteurs)	212
Figure 101 : Évolution de la glycémie durant le programme nutritionnel	213
Figure 102 : Variations de la glycémie selon le régime et la période	213
Tableau 18 : Corrélations identifiées entre les paramètres biologiques et métaboliques	214
Figure 103 : Évolution des taux de DHA érythrocytaire.....	215
Tableau 19 : Évolution des taux de DHA érythrocytaire (ANOVA à 2 facteurs)	215
Figure 104 : Évolution des taux de DHA érythrocytaire selon la période	216
Figure 105 : Variations des taux de DHA érythrocytaire selon le régime et la période	217
Figure 106 : Évolution du ratio des AGPI érythrocytaires	218
Figure 107 : Évolution des taux d'AGPI érythrocytaires selon la période.....	218

Tableau 20 : Évolution des taux d'AGPI érythrocytaires (ANOVA à 2 facteurs)	219
Figure 108 : Variations des taux d'AGPI érythrocytaires selon le régime et la période	219
Tableau 21 : Évolution des taux d'AGMI érythrocytaires (ANOVA à 2 facteurs).....	219
Tableau 22 : Évolution des taux d'AGS érythrocytaires (ANOVA à 2 facteurs).....	220
Figure 109 : Évolution des teneurs érythrocytaires en AGMI et AGS.....	220
Figure 110 : Évolution des teneurs érythrocytaires en AGMI et AGS selon le régime et la période.....	221
Figure 111 : Corrélations entre DHA érythrocytaire et paramètres de dyslipidémie	221
Figure 112 : Étude du glutathion sanguin au terme du programme nutritionnel	223
Figure 113 : Influence des AGPI sur le statut redox érythrocytaire.....	224
Figure 114 : Évolution de la motivation des souris au long des répétitions du test du Y.....	225
Tableau 23 : Évolution de la mémoire spatiale des souris âgées de 9 à 15 mois (ANOVA à 2 facteurs).....	226
Figure 115 : Évolution de la mémoire spatiale durant le programme nutritionnel	227
Figure 116 : Évolution de la mémoire spatiale selon la période	227
Figure 117 : Évolution de la mémoire spatiale durant le programme nutritionnel	228
Tableau 24 : Évolution de la mémoire spatiale des souris âgées de 6 à 12 mois (ANOVA à 2 facteurs).....	228
Figure 118 : Influence des régimes sur la mémoire spatiale après 12 semaines	229
Figure 119 : Influence des taux d'AGPI sur la mémoire spatiale après 12 semaines.....	230
Figure 120 : Influence des taux d'AGPI sur la mémoire spatiale après 12 semaines.....	231
Tableau 25 : Effets du stress amyloïde sur la mémoire spatiale des souris (ANOVA à 2 facteurs).....	233
Figure 121 : Influence des régimes sur la mémoire spatiale après injection	233
Figure 122 : Influence des régimes sur la sensibilité au stress amyloïde (mémoire spatiale)	234
Figure 123 : Influence des régimes sur la mémoire spatiale des souris exposées à A β	235
Tableau 26 : Effets du stress amyloïde sur les capacités d'apprentissage des souris (ANOVA à 2 facteurs)	236
Figure 124 : Influence des régimes sur les capacités d'apprentissage (profils)	237
Figure 125 : Influence des régimes sur les capacités d'apprentissage (latences cumulées).....	237
Figure 126 : Influence des régimes sur la sensibilité au stress amyloïde (apprentissage).....	238
Figure 127 : Influence des régimes sur l'apprentissage des souris exposées à A β	238
Tableau 27 : Effets du stress amyloïde sur la mémoire à long terme des souris (ANOVA à 2 facteurs).....	239
Figure 128 : Influence des régimes sur la mémoire à long terme	240
Figure 129 : Influence des régimes sur la sensibilité au stress amyloïde (mémoire à long terme).....	241
Figure 130 : Influence des régimes sur la mémoire à long terme des souris exposées à A β	241
Figure 131 : Corrélations entre les capacités des différentes formes de mémoire	242
Tableau 28 : Effets des régimes sur les taux d'acides gras cérébraux (ANOVA à 2 facteurs).....	243
Figure 132 : Influence des régimes sur les teneurs en AGPI dans l'hippocampe des souris	244
Figure 133 : Comparaison des effets des régimes sur les AGPI des divers tissus testés.....	245
Figure 134 : Corrélations entre les ratios d'AGPI érythrocytaires et cérébraux	245
Figure 135 : Corrélations entre les AGPI dans l'hippocampe et la mémoire à long terme.....	246
Figure 136 : Étude par immunoblot des protéines synaptiques de l'hippocampe (analyse sélective).....	248
Figure 137 : Effets des régimes sur les protéines synaptiques de l'hippocampe (analyse sélective)	248
Tableau 29 : Analyse systématique des protéines synaptiques cérébrales (ANOVA à 2 facteurs).....	249
Figure 138 : Effets des régimes sur les protéines synaptiques (analyse systématique).....	250
Figure 139 : Relations entre protéines synaptiques de l'hippocampe et capacités mnésiques.....	251
Figure 140 : Relations entre AGPI et protéines synaptiques dans l'hippocampe	252

ABRÉVIATIONS

αCTF	Fragment C-terminal C83	DMSO	Diméthylsulfoxyde
AAC	Angiopathie amyloïde cérébrale	DNF	Dégénérescence neurofibrillaire
ACAT	Acyl-CoA cholestérol acyltransférase	DPA	Acide docosapentaénoïque
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine	EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
AG	Acide gras	EE	Ester éthylique
AGE	<i>Advanced glycation end-products</i>	EGCG	Epigallocatechinegallate
AGI	Acide gras insaturé	ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
AGMI	Acide gras mono-insaturé	EPA	Acide eicosapentaénoïque
AGPI	Acide gras polyinsaturé	EpRE	<i>Electrophile response element</i>
AGPI-1c	AGPI à longue chaîne	ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
AGS	Acide gras saturé	ERO	Espèces réactives de l'oxygène
AICD	Domaine intracellulaire de l'APP	γGCS	γ-Glutamyl cystéine synthétase
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien	GABA	Acide gamma-aminobutyrique
AKT	Protéine kinase B	GPDH	Glycérol 3-phosphate déshydrogénase
ALA	Acide α-linolénique	GPI	Glycosylphosphatidylinositol
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-méthylisol-4-propionate	GPx	Glutathion peroxydase
AMPc	AMP cyclique	GR	Glutathion réductase
ANOVA	Analyse de la variance	GRX2	Glutarédoxines
ApoE	Apolipoprotéine E	GSH	Glutathion
APP	Protéine précurseur de l'amyloïde	GSH	Glutathion réduit
APP ^{swe}	Mutation <i>Swedish</i> de la protéine APP	GSK3	<i>Glycogen synthase kinase-3</i>
ARA	Acide arachidonique	GSSG	Glutathion oxydé
ARE	<i>Antioxidant responsive element</i>	H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
ATP	Adénosine triphosphate	HEK	Human Embryonic Kidney
AV	Alcool vanillique	HMG-CoA	3-Hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
Aβ	Peptide β-amyloïde	HMGCR	HMG-CoA réductase
AβOs	Oligomère soluble de peptide Aβ	HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
BACE	Enzyme de clivage du site β d'APP	ICV	Injection intracérébroventriculaire
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>	IDE	Enzyme de dégradation de l'insuline
BHE	Barrière hémato-encéphalique	IL6	Interleukine-6
Chol-HDL	Cholestérol-lipoprotéine de haute densité	IMC	Indice de masse corporelle
Chol-LDL	Cholestérol-lipoprotéine de faible densité	iPLA ₂	PLA ₂ indépendante du Ca ²⁺
COX	Cyclooxygénase	IRM	Imagerie par résonance magnétique
CPG	Chromatographie en phase gazeuse	IRMf	IRM fonctionnelle
cPLA ₂	Phospholipase A ₂ cytosolique	JNK1/2	<i>c-Jun N-terminal kinase 1 et 2</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>	LA	Acide linoléique
DAG	Diacylglycérol	LCR	Liquide céphalorachidien
DHA	Acide docosahexaénoïque	LDL	Lipoprotéine de basse densité
DHA-EE	Ester éthylique de DHA	LOX	Lipoxygénase
DHA-VE	Ester vanillique de DHA	LRP	<i>LDL receptor-related protein</i>
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco	LTD	Dépression synaptique à long terme

LTP	Potentialisation à long terme	PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
LXR	<i>Liver X receptor</i>	POP	Polluants organiques persistants
MA	Maladie d'Alzheimer	PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
MAG	Monoacylglycérol	PP-O•	Radical aryloxy
MAO	Monoamine oxydases	PrP ^C	Protéine du prion cellulaire
MAP	<i>Microtubule associated protein</i>	PRX	Peroxyrédoxines
MAPK	<i>Mitogene activated protein kinase</i>	PS	Phosphatidylsérine
MCI	Mild Cognitive Impairment	PSD-95	<i>Post-synaptic density-95</i>
MMSE	Mini Mental State Examination	PVDF	Difluorure de polyvinylidène
MP	Maladie Parkinson	R•	Radical
MβCD	Méthyl-β-cyclodextrine	RAGE	Récepteur aux AGE
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate	RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>	RE	Réticulum endoplasmique
NGF	<i>Nerve growth factor</i>	RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate	s-APPα	APPα soluble
NO	Oxyde nitrique	SA	Acide stéarique
NPD1	Neuroprotectine D1	SDS	Dodécylsulfate de sodium
O ₂ ⁻	Radical (ou anion) superoxyde	SM	Sphingomyéline
OA	Acide oléique	SMase	Sphingomyélinase
ox-LDL	LDL oxydées	SNAP25	<i>Synaptosomal-associated protein 25</i>
P53	<i>Tumor protein 53</i>	SNARE	<i>Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor</i>
PA	Acide palmitique	SNC	Système nerveux central
PBS	Tampon phosphate salin	SOD	Superoxyde dismutase
PC	Phosphatidylcholine	SorLA/LR11	Récepteur lié à la sortiline
PCB	Biphényles polychlorés	sPLA2	PLA ₂ sécrétée
PE	Phosphatidyléthanolamine	SVF	Sérum de veau fœtal
Pen 2	<i>Presentin enhancer 2</i>	TAG	Triacylglycérol
PGPX	Glutathion peroxydase des hydroperoxydes de phospholipides	TEP	Tomographie par émission de positons
PHF	<i>Paired helical filament</i>	TG	Triglycéride
PI	Phosphatidylinositol	TNF-α	Facteur de nécrose tumoral alpha
PI3K	PI3-kinase	TrkB	Tyrosine kinase B (tropomyosin-related kinase B)
pKA	Protéine kinase A	TRX2	Thiorédoxine
PKB	Protéine kinase B	TRXR2	Thiorédoxine réductase
PL	Phospholipide	VLDL	Lipoprotéine de très basse densité
PLA ₂	Phospholipase A ₂		

AVANT-PROPOS

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'études réalisées au sein du laboratoire Lipidomix, visant à étudier l'effet de composés alimentaires capables de prévenir le vieillissement cérébral et les maladies neurodégénératives par des expérimentations menées *in vitro* sur des modèles cellulaires et *in vivo* sur une souris modèle de stade précoce de maladie d'Alzheimer.

Ce manuscrit comprend deux chapitres principaux en plus des parties habituelles.

1. **La situation du sujet.** Proposé en introduction, ce chapitre a été divisé en trois parties. La première partie est consacrée à la problématique complexe du vieillissement cérébral et précise les éléments qui conduisent au déclin cognitif et plus particulièrement à la maladie d'Alzheimer. L'influence de facteurs nutritionnels y est plus particulièrement développée. La deuxième partie s'intéresse aux lipides alimentaires (cholestérol et acides gras polyinsaturés ou AGPI *n-3*), identifiés comme des composés dont l'apport est susceptible d'influer sur le développement de la maladie d'Alzheimer. Enfin, la troisième partie est focalisée sur les polyphénols, molécules naturelles d'origine végétale et qui sont douées d'activités biologiques d'intérêt thérapeutique.
2. **Les résultats.** Ce chapitre se compose globalement de 2 parties. La première partie décrit la stratégie expérimentale et les résultats de travaux réalisés *in vivo* pour étudier les effets d'une supplémentation alimentaire en acide docosahexaénoïque (DHA ; C22:6 *n-3*) chez une souris modèle de la maladie d'Alzheimer. Cette partie aborde aussi l'étude des propriétés neuroprotectrices *in vitro* d'une molécule originale, l'ester vanillique de DHA, ainsi que les premiers résultats après supplémentation nutritionnelle chez la souris. La seconde partie relate en détail une étude sur les effets d'AGPI *n-3* extraits d'huile de poisson contre le vieillissement cérébral et le déclin cognitif normal, ainsi qu'en conditions de stress amyloïde. Cette partie présente également l'intérêt de cette supplémentation sur la dyslipidémie et les effets délétères d'un régime enrichi en lipides (acides gras saturés et cholestérol) sur le déclin cognitif normal et le vieillissement accéléré par exposition au peptide β -amyloïde, l'agent neurotoxique central de la maladie d'Alzheimer.

Ce mémoire de thèse est le résultat d'un travail de recherche visant à évaluer l'effet bénéfique d'une approche préventive nutritionnelle d'intérêt permettant de préserver les fonctions cérébrales et retarder le déclin cognitif lié au vieillissement normal ainsi que l'apparition de la maladie d'Alzheimer. Ce travail représente une étape importante pour mieux comprendre les propriétés neuroprotectrices des acides gras polyinsaturés oméga-3 et progresser vers le développement d'approches nutritionnelles qui puissent permettre de prévenir ou retarder la survenue de syndromes liés au vieillissement, la maladie d'Alzheimer en particulier.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les populations occidentales bénéficient d'un allongement de la durée de vie dont l'avantage réel est très directement lié à l'impression de bien-être des personnes âgées, dépendant elle-même de la durée de vie sans pathologie lourde ou invalidante. Ainsi, en France, l'INSEE a rapporté en 2010 une espérance de vie toujours en croissance, atteignant désormais 84,8 ans pour les femmes et 78,1 ans pour les hommes. En dix ans, l'espérance de vie a ainsi progressé respectivement de 2,9 et 2 ans pour les hommes et les femmes. Parallèlement, l'espérance de vie sans incapacité de cette même population a même plutôt tendance à reculer selon les derniers chiffres publiés par Eurostat, passant de 64,6 et 62,7 ans en 2008 à 63,5 et 61,9 ans en 2010 pour les femmes et les hommes respectivement. L'analyse de ces données statistiques interroge sur l'intérêt réel de bénéficier d'une espérance de vie à la naissance qui s'allonge, alors que la qualité de vie se dégrade, en raison notamment de l'augmentation des maladies chroniques liées au vieillissement, parmi lesquelles les cancers, le diabète ainsi que les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. Cette situation impose à notre société un problème de santé publique d'une extrême acuité, nécessitant notamment des budgets de plus en plus lourds pour résoudre l'équation médicale, sociale et financière permettant de répondre à une demande de soins croissante et de faire face à ce fameux 5^e risque, celui de la dépendance.

La maladie d'Alzheimer (MA), l'une des principales maladies associées au vieillissement, est une démence progressive qui se manifeste dans ses stades précoces par l'incapacité de former de nouveaux souvenirs. La prévalence actuelle de cette pathologie, déjà élevée, ne peut qu'augmenter puisque l'âge est le principal facteur de risque et qu'aucune solution thérapeutique réellement efficace n'a encore été validée pour préserver ou restaurer les capacités cognitives. Ce syndrome semble débiter au niveau de l'hippocampe par un dysfonctionnement synaptique discret précédant la mort neuronale par apoptose. Les bases moléculaires de cette spécificité sont encore imprécises et les connaissances fondamentales doivent encore être améliorées avant de disposer des traitements appropriés. Toutefois, un large consensus semble aujourd'hui considérer que la perte synaptique dans la MA résulte, au moins lors des stades précoces, de mécanismes cytotoxiques initiés par le peptide β -amyloïde ($A\beta$) sous la forme d'oligomères solubles dès son interaction avec la membrane neuronale. C'est ainsi que ces oligomères ont été incriminés dans la toxicité régiospécifique vis-à-vis des neurones de la région CA₁ de l'hippocampe impliquée dans les fonctions cognitives. De nombreux arguments suggèrent que les mécanismes physiopathologiques à l'origine de MA puissent être activés bien avant l'apparition des premiers symptômes cliniques et il semble évident que des mesures préventives doivent pouvoir être préconisées durant cette large fenêtre asymptomatique, à l'instar de ce qui existe pour prévenir les

maladies cardiovasculaires. Celles-ci partagent d'ailleurs de nombreux facteurs de risque communs avec la maladie d'Alzheimer, notamment les paramètres nutritionnels dont le rôle déterminant dans les processus de vieillissement a été souligné par nombreuses études.

Les lipides sont des molécules importantes pour les fonctions cellulaires. Ils sont présents en grandes concentrations dans le système nerveux central où ils assurent des fonctions structurales, biochimiques, et de signalisation cellulaire. La préservation des activités cellulaires normales nécessite le maintien d'une homéostasie lipidique modulable selon l'environnement, l'individu, le terrain génétique et l'âge. Les dyslipidémies correspondent à des situations dans lesquelles cette homéostasie est perturbée, ce qui peut être détecté au travers des profils altérés des lipides et lipoprotéines circulants. Par exemple, la dyslipidémie, qui chez l'homme se traduit principalement par une élévation de la cholestérolémie et de la triglycéridémie, est fréquemment associée à l'obésité. Depuis plusieurs décennies, l'alimentation occidentale connaît un déséquilibre croissant des apports entre les deux grandes familles d'acides gras polyinsaturés *n-6* et *n-3*. Cette évolution des habitudes alimentaires provoque une diminution de la disponibilité tissulaire des dérivés de la série *n-3*, en particulier de l'acide docosahexaénoïque, dont les propriétés globalement anti-inflammatoires se distinguent des acides gras de type *n-6* précurseurs de l'inflammation. Ce déséquilibre a été directement corrélé à l'augmentation du risque de survenue de pathologies liées au vieillissement, notamment la MA, puisque les patients atteints de cette maladie semblent montrer des taux inférieurs en acide docosahexaénoïque (DHA) dans le plasma comme dans les tissus cérébraux où il représente normalement l'acide gras polyinsaturé majoritaire. Ceci consolide les conclusions des études épidémiologiques sur les populations humaines consommant des poissons gras riches en acides gras *n-3* et montrant un risque réduit de démence. Les expérimentations animales montrent par ailleurs la possibilité d'enrichir les membranes neuronales en DHA en réponse à un régime alimentaire supplémenté en cet acide gras ou en huiles de poisson, ce qui pourrait s'avérer d'une efficacité prometteuse contre cette maladie. Sur la base des propriétés neuroprotectrices du DHA largement documentées, des études cliniques ont testé la possibilité de traiter la MA par des interventions nutritionnelles, mais les résultats ont été globalement négatifs. Si l'on peut supposer que le DHA participe à l'organisation d'une membrane neuronale pleinement fonctionnelle et moins sensible à l'impact des oligomères A β , il est probable que ce genre d'effet devienne impossible dans un neurone âgé déjà altéré par le vieillissement. Ceci suggère que le DHA puisse devenir un nutriment dont la consommation doit être recommandée dans le but de préserver un fonctionnement cérébral optimal et de prévenir l'apparition des troubles cognitifs liés à l'âge. Mais la recherche doit encore progresser pour identifier les mécanismes sur lesquels repose l'effet neuroprotecteur du DHA et ainsi optimiser une approche préventive encore bien trop empirique, souvent basée sur de simples allégations. De nombreuses preuves expérimentales existent, mais d'autres restent à apporter.

SITUATION DU SUJET

A. Vieillesse cérébrale normale ou pathologique

Le vieillissement rapide de la population, en particulier dans les pays industriels, et le bond remarquable de l'espérance de vie ces dernières décennies ont entraîné une prise de conscience de l'importance de ce problème. En effet, depuis 1950, la proportion mondiale de personnes âgées augmente de manière constante : elle est passée de 8% en 1950 à 11% en 2009 et, selon les prévisions, devrait atteindre 22% en 2050. En 2000, on comptait 600 millions de personnes âgées de 60 ans et plus dans le monde, soit le triple par rapport à 1950. En 2009, les personnes âgées étaient plus de 700 millions. En 2050, on estime qu'elles seront 2 milliards, soit un nouveau triplement en 50 ans. Au niveau mondial, le nombre de personnes âgées augmente de 2% par an, nettement plus rapidement que la population globale qui croît à un taux annuel de 1,2%. Cette tendance devrait persister au moins jusqu'en 2050 (World Population Ageing 1950-2050). La proportion de personnes âgées dans les pays industriels augmente avec une pente sûrement plus élevée. Ainsi, dans l'Union Européenne, elle est passée de 16% en 2000 à 17% en 2010 et, selon les prévisions, devrait atteindre 29% en 2050 (Lutz & K C, 2010). En France métropolitaine, alors que 21 % de la population résidente avait 60 ans ou plus en 2007, cette proportion serait de 31 % en 2035 et de 32 % en 2060, et le nombre de personnes âgées de 60 ans et plus augmenterait de 10,4 millions entre 2007 et 2060. En 2060, 23,6 millions de personnes seraient ainsi âgées de 60 ans ou plus, soit une hausse de 80 % en 53 ans. L'augmentation est la plus forte pour les plus âgés : le nombre de personnes de 75 ans ou plus passerait de 5,2 millions en 2007 à 11,9 millions en 2060 ; celui des 85 ans et plus de 1,3 à 5,4 millions (Blanpain & Chardon, Insee, 2010).

1. Définition et aspects biologiques

L'apparition de certaines maladies fréquentes chez les personnes âgées est souvent associée au processus de vieillissement lui-même, imposant une image très inquiétante de la dernière période de la vie. Ces dernières années, la recherche sur le vieillissement et le contrôle de la longévité ont connu un grand intérêt, en raison des nombreuses questions de santé publique et de la pression socioéconomique qui résultent de cette situation. La Figure 1 montre une augmentation importante du nombre de publications parues depuis 1985 dans des journaux à facteur d'impact élevé, reflétant l'importance accordée aux études destinées à mieux comprendre ce phénomène.

Les progrès de la science permettent de bien distinguer le vieillissement physiologique du vieillissement pathologique. Rowe & Kahn (1997) ont distingué trois types de vieillissement.

- Le vieillissement pathologique est corrélé à un taux supérieur de morbidité en raison d'une susceptibilité accrue vis-à-vis de diverses maladies ou handicaps susceptibles de menacer l'autonomie de la personne âgée : troubles locomoteurs, troubles sensoriels, dépression, démences, affections

cardiovasculaires, etc. Ce type de vieillissement est fréquemment aggravé par l'état de dénutrition.

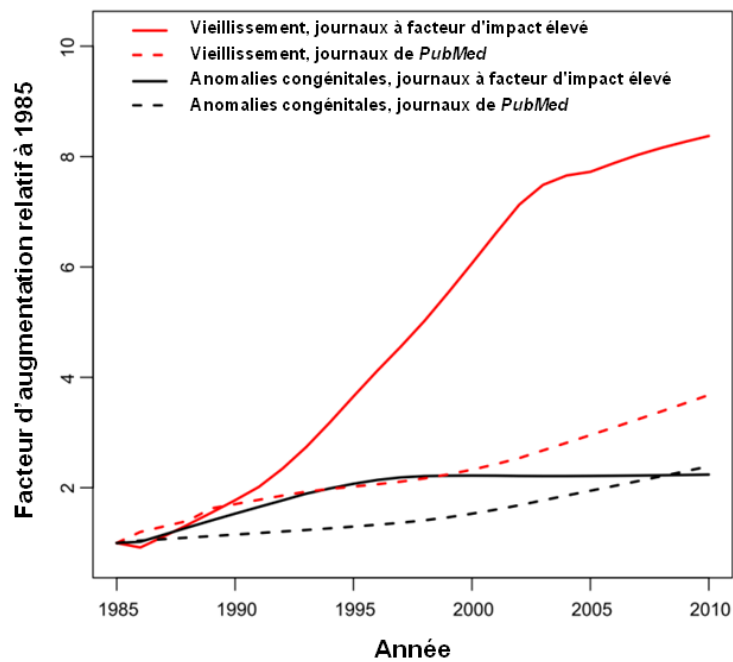


Figure 1 : Augmentation du nombre de publications parues depuis 1985 (d'après Martin, 2011)

Facteurs d'augmentation (par rapport à l'année 1985) des publications référencées sur PubMed sous le mot clé « vieillissement » (Aging), considérant les revues à facteur d'impact élevé (Science, Nature, Cell, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, et FASEB Journal, ligne en trait plein rouge) ou toutes les revues sans distinction (ligne pointillée rouge). À titre comparatif, une recherche simultanée a été faite sur un autre mot clé « Anomalies congénitales » (Congenital abnormalities) selon le même principe. Le nombre d'articles publiés sur le vieillissement dans les journaux à facteur d'impact élevé a crû de façon très supérieure à celui dans toutes les revues de PubMed. De même, le nombre d'articles sur le vieillissement a été significativement augmenté depuis 1985, alors qu'il reste globalement constant depuis le début des années 1990 sur les anomalies congénitales.

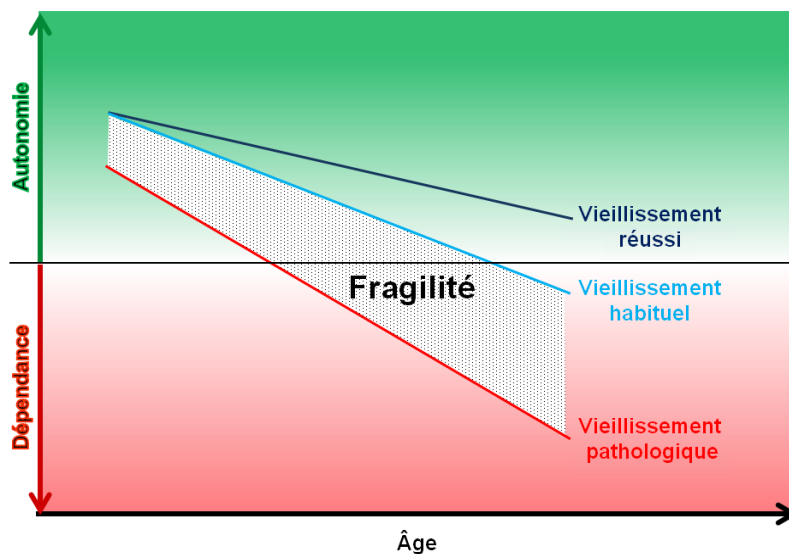


Figure 2 : Représentation des trois modes de vieillissement fonctionnel (d'après Trivalle, 2004)

Vieillissement réussi, avec une absence ou une atteinte minimale des fonctions physiologiques et une absence de pathologie. Vieillissement normal (ou habituel), avec des atteintes considérées comme physiologiques,

liées à l'âge, mais sans pathologie bien définie. Vieillesse pathologique, avec des maladies évolutives ou complexes, associées à un handicap et responsables le plus souvent d'un état de dépendance.

- Le vieillissement habituel est un syndrome de fragilité déterminé par les processus de vieillissement physiologique intrinsèque, principalement gouverné par des aspects génétiques, avec une association élevée aux risques (Figure 2). Il s'agit d'une réduction des réserves adaptatives qui peut induire un déséquilibre en cas de survenue d'un phénomène aigu (Fulop *et al.*, 2010).

- Le vieillissement réussi est lié à une probabilité plus faible de déclencher une maladie. Il se distingue du vieillissement normal par des capacités cognitives et fonctionnelles élevées, rendant possible un engagement actif dans la vie quotidienne. Il s'intègre ainsi dans un contexte plus large de qualité de vie, considérant que l'individu jouit d'une santé préservée, conserve un rôle social significatif et entretient des liens affectifs et relationnels satisfaisants à l'égard de son entourage familial (Lupien & Wan, 2004 ; Buffa *et al.*, 2011). Ce type de vieillissement semble caractérisé par une grande hétérogénéité entre les profils des individus âgés, certainement en raison de la multiplicité des facteurs environnementaux le favorisant.

La problématique du vieillissement intègre donc différents niveaux : biologique, physiologique, morphologique, cellulaire et moléculaire, ainsi que social et psychologique. La distinction entre ces niveaux n'est pas toujours facile, en particulier chez l'homme. Le vieillissement, aussi appelé sénescence, peut se définir par l'ensemble des processus physiologiques et psychologiques complexes, lents, progressifs, inévitables, irréversibles et multifactoriels qui, après la phase de maturité, modifient la structure et les fonctions d'un être vivant sous l'effet du temps. Le vieillissement résulte donc de facteurs génétiques ou intrinsèques et environnementaux ou extrinsèques (Miller & O'Callaghan, 2005 ; Tosato *et al.*, 2007).

Le vieillissement cérébral se traduit par une atteinte progressive des fonctions cognitives, parmi lesquelles un déficit mnésique, notamment de la mémoire spatiale (Klencklen *et al.*, 2012), une diminution des performances intellectuelles (Lee *et al.*, 2005 ; Mell *et al.*, 2005), ainsi qu'un dysfonctionnement du système exécutif (Lai *et al.*, 1995) et attentionnel (Zhou *et al.*, 2011). D'une manière générale, toutes les fonctions cognitives semblent affectées avec une importante variabilité interindividuelle dans la nature et la progression du déclin cognitif lié à l'âge (Ylikoski *et al.*, 1999).

Au cours du vieillissement, le cerveau se modifie à l'échelle macroscopique et microscopique. DeCarli *et al.* (2005) ont montré que le cerveau rétrécit de façon marquée avec l'âge. Ce rétrécissement est accompagné d'un élargissement des sillons et d'une augmentation du volume des ventricules. Quant à la perte neuronale éventuelle liée au vieillissement, aucune association significative n'a été démontrée (Dickstein *et al.*, 2007 ; Mora *et al.*, 2007). Par contre, le vieillissement est nettement associé à des changements régio-spécifiques de la morphologie dendritique, de la physiologie synaptique et des connexions cellulaires, ainsi qu'à une dérégulation des niveaux cellulaires de Ca^{2+} et de l'expression des gènes. Tous ces facteurs contribuent en conséquence à diminuer la plasticité neuronale et à altérer le réseau de connexions (Burke & Barnes, 2006 ; Bishop *et al.*, 2010). Ainsi, chez les animaux âgés, on

observe une chute significative de concentrations de neuromédiateurs (Mora *et al.*, 2008), de leurs récepteurs et des capacités de liaison de ces récepteurs (Dickstein *et al.*, 2007).

Malgré une espérance de vie très différente selon les organismes, on observe communément avec l'âge une apparition de déficits très divers : diminution de l'élasticité des tissus, des défenses immunitaires, de la force musculaire, de l'efficacité des organes des sens, de la rapidité des réflexes, du contrôle génétique, sans oublier bien entendu la perte de mémoire et l'augmentation des risques de maladies liées à l'âge (ostéoporose, arthrose, diabète de type II, maladies cardiovasculaires, cataracte et dégénérescence musculaire, maladies neurodégénératives, cancer...). Au niveau cellulaire, l'accumulation des protéines modifiées et l'altération des mécanismes d'élimination de ces protéines aboutissent à une diminution progressive des fonctions des organes et mènent au vieillissement. Les lipides subissent aussi une oxydation, la peroxydation, liée à l'âge, ce qui contribue à l'apparition de syndromes pathologiques liés à la rigidification des parois artérielles, au dysfonctionnement des membranes cellulaires ou aux altérations du système nerveux central.

Même si tous les mécanismes responsables du vieillissement ne sont pas encore élucidés, les progrès de la recherche permettent aujourd'hui de mieux comprendre comment certains facteurs peuvent influencer sur ce processus. Mais le vieillissement est un phénomène complexe et multifactoriel dont aucun processus biologique unique ne pourrait totalement expliquer l'origine ou les conséquences. Il existe cependant de nombreuses théories explicatives développées au niveau cellulaire et moléculaire et basées sur différentes hypothèses génétiques ou stochastiques (non génétiques).

a. Les hypothèses génétiques

Les liens entre génétique et vieillissement sont étroits. Certains facteurs génétiques semblent en effet capables d'influer sur la durée de vie.

i. La théorie génétique

Plusieurs études ont mis en évidence des relations étroites entre certains facteurs génétiques et le vieillissement. Cette théorie affirme que notre héritage génétique détermine en grande partie le rythme auquel nous vieillissons et l'âge maximum que nous atteindrons. En effet, la manipulation de gènes spécifiques a permis de modifier la longévité chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Lakowski & Hekimi, 1996), *Drosophila melanogaster* (Krishnan *et al.*, 2009 ; Gáliková *et al.*, 2011), et la souris (Guarente & Kenyon, 2000). L'inactivation de voies de signalisation hormonale dont celle analogue de l'insuline peut induire un allongement de la vie chez de nombreuses espèces (Tatar *et al.*, 2003). Chez l'homme, les études menées chez les jumeaux ont évalué que les facteurs génétiques sont responsables de 30 à 35% des aspects de longévité ; la durée de vie est significativement liée entre jumeaux monozygotes, davantage qu'entre jumeaux hétérozygotes ou qu'entre frères et sœurs (McGue *et al.*, 1993). Par ailleurs, l'origine génétique des syndromes de vieillissement prématuré chez l'homme

comme les syndromes de Werner, Hutchinson-Gilford, Down, Bloom et Cockayne souligne l'importance des facteurs héréditaires dans le contrôle du vieillissement (Dyer & Sinclair, 1998).

ii. La théorie de l'horloge biologique

Les travaux de Hayflick en 1961 ont démontré que plusieurs lignées cellulaires semblaient aptes à subir un nombre défini de divisions cellulaires, proportionnel à la longévité de l'espèce, mais avec des écarts entre les individus d'une même espèce. Les théories actuelles expliquent ce phénomène en incriminant le raccourcissement des télomères. Le télomère est une région d'ADN hautement répétitif, de séquence TTAGGG chez l'homme, présente à l'extrémité de chaque chromosome dont il contribue à maintenir la stabilité. Cet ADN répétitif représente une région longue d'environ 15 kb à la naissance, synthétisée par la télomérase, une ribonucléoprotéine à activité transcriptase inverse. Toutefois, cette enzyme ne s'exprime que peu, voire même pas dans les cellules somatiques, alors qu'elle est très active dans les cellules germinales. L'expression de cette enzyme semble nécessaire pour éviter la mort cellulaire, son absence pouvant accélérer le vieillissement cellulaire (Ahmed & Tollefsbol, 2001). Inversement, sa surexpression est associée à l'immortalisation des cellules somatiques différenciées, devenues cancéreuses et caractérisées par un génome d'une grande instabilité (Shay & Wright, 2011). En effet, à chaque cycle de division cellulaire, le chromosome se raccourcit en raison de l'incapacité des répliques à synthétiser les extrémités 5' de la double hélice. Ce raccourcissement peut aboutir à une érosion des chromosomes telle que les informations génétiques qu'ils portent peuvent finalement être altérées. Ceci force alors les cellules à devenir sénescents et à cesser de se diviser, processus parfois appelé vieillissement répliatif. Selon leur longueur, les télomères assurent donc la possibilité pour la cellule de subir sans problème un nombre donné de divisions cellulaires – et donc de raccourcissements des extrémités – tout en préservant l'intégrité des chromosomes, en tout cas dans ses régions internes, sans perte donc d'information génétique déterminante (Hayflick, 1998). Ainsi, les télomères pourraient être de bons supports pour constituer l'horloge biologique de la cellule capable de décompter le nombre de divisions cellulaires (Tosato *et al.*, 2007).

b. Les hypothèses stochastiques (aléatoires)

Ce groupe de théories fait intervenir des facteurs de l'environnement ou des mécanismes générant des composés néfastes dont l'accumulation est susceptible d'accélérer le vieillissement.

i. La théorie des radicaux libres (théorie mitochondriale)

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, fragment de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (libre) en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Ceci lui confère une grande réactivité, donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aspire à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus

stable, il va donc se réduire en oxydant un autre composé (système redox). La réactivité chimique des radicaux libres de l'oxygène varie selon la molécule considérée, mais ce sont pour la plupart de puissants oxydants. Les principaux radicaux libres entrant dans les processus physiopathologiques humains sont les radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) et hydroxyles (OH^{\bullet}), mais d'autres dérivés de l'oxygène jouent également un rôle important dans le stress oxydant, en particulier le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxydinitrite (NO_2^{\bullet}). C'est pourquoi le terme d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) est préféré à celui de radicaux libres, le peroxyde d'hydrogène n'étant pas un radical libre. Bien que potentiellement inactivées par les divers systèmes antioxydants intracellulaires (glutathion, peroxydases, superoxyde dismutases, *etc.*), ces espèces, produites au cours du métabolisme de l'oxygène, peuvent s'accumuler, perturbant ainsi l'équilibre redox de la cellule. Le stress oxydant ainsi généré représente une menace capable d'altérer toutes les biomolécules telles que les lipides membranaires, les protéines et les acides nucléiques. Ces altérations peuvent entraîner des anomalies dans l'expression des gènes, des dysfonctionnements membranaires, ainsi qu'une dérégulation du cycle cellulaire.

La théorie radicalaire du vieillissement a été proposée par Denham Harman au milieu des années 1950. Cette théorie est fondée sur l'accumulation avec le temps des radicaux libres et des dommages cellulaires qu'ils produisent, conduisant au vieillissement et la mort. En 1972, il a proposé que les radicaux libres soient produits principalement dans la mitochondrie, la capacité de cet organite à résister aux attaques radicalaires étant alors un élément déterminant de la longévité. Cette théorie est aujourd'hui soutenue par les résultats de nombreux travaux et est la plus admise par la communauté scientifique (Finkel & Holbrook, 2000 ; Hulbert, 2010 ; Salmon *et al.*, 2010).

ii. La théorie de la glycation non enzymatique des protéines (cross-linking)

La glycation non enzymatique est une réaction chimique de liaison entre les radicaux glucidiques (glucose, pentose) et les acides aminés des protéines et d'autres molécules. Cette réaction, appelée réaction de Maillard, est très lente et concerne principalement les molécules à très longue demi-vie, telles que le collagène, l'élastine et les histones.

Ces liaisons ou pontages moléculaires apparaissent particulièrement dans les hyperglycémies. Ainsi, les protéines à longue demi-vie subissent des modifications au contact du glucose. Ce dernier réagit spontanément avec les fonctions amines des acides aminés pour former une base de Schiff, ce qui conduit à des produits de glycation avancée (ou AGE, *advanced glycation end-products*). Sont principalement touchées les protéines de la matrice extracellulaire. La glycation modifie les propriétés de ces protéines, ce qui les rend plus résistantes aux protéases et empêche leur remplacement (Tessier, 2010). Plusieurs conséquences ont été citées dans la littérature concernant la glycation des protéines : (i) la formation de pontages moléculaires entre les fibres de collagène diminue leur solubilité, ce qui rend les tissus plus rigides et plus résistants aux protéases, contrariant ainsi la communication et les interactions entre les cellules ; (ii) les AGE activent des récepteurs spécifiques et stimulent la libération

de facteurs de croissance ou de médiateurs de l'inflammation ; (iii) en s'accumulant lors du vieillissement, les macromolécules glyquées causent des dysfonctionnements comme il l'a été relevé dans l'appareil cardiovasculaire, la peau, le cristallin et les membranes basales ; (iv) moins accessibles aux récepteurs chargés de leur clairance, les lipoprotéines LDL (*low-density lipoprotein*) glyquées s'accumulent dans le compartiment plasmatique, augmentant ainsi le risque cardiovasculaire ; (v) les superoxyde dismutases glyquées perdent leur capacité à inactiver l'anion superoxyde, ce qui favorise la cascade radicalaire et augmente les taux d'ERO, donc le stress oxydant (Edeas *et al.*, 2010).

iii. La théorie de la restriction énergétique (restriction diététique)

De nombreuses études menées chez diverses espèces animales (nématodes, insectes, poissons, rongeurs, singes) et chez l'homme suggèrent que la restriction calorique équilibrée (ou restriction diététique) aurait la capacité de prévenir le vieillissement, en conséquence de l'induction de modifications métaboliques, hormonales et fonctionnelles favorables (Fontana and Klein, 2007 ; Martin, 2011). Par exemple, les habitants d'Okinawa (Kagawa, Japon), qui ont la durée de vie la plus élevée au monde, consomment 40% calories de moins que les américains et vivent 4 ans de plus. L'effet au long cours du régime alimentaire traditionnel de l'île d'Okinawa, caractérisé par un régime faible en calories mais riche en nutriments (sans malnutrition), favoriserait leur longévité exceptionnelle (Willcox *et al.*, 2007). Une autre étude menée chez l'homme a montré qu'une intervention nutritionnelle conduisant à une restriction calorique peut améliorer les performances cognitives de sujets à problèmes métaboliques (Witte *et al.*, 2009). Cette hypothèse suggère que la restriction diététique pourrait agir en ralentissant la glycation de protéines ou en préservant l'organisme de la formation d'ERO et du stress oxydant.

2. Maladies liées au vieillissement

En parallèle, du fait de la longévité croissante de la population, il est observé une explosion des maladies liées à l'âge. C'est le cas notamment des affections cardiovasculaires, du diabète, des cancers et des maladies neurodégénératives.

a. Le diabète insulino-résistant

Chez l'homme, le diabète de type 2, dit insulino-résistant, survient le plus souvent entre 55 et 75 ans. La corrélation entre l'âge et la survenue du diabète peut s'expliquer par la réduction progressive physiologique de la sécrétion d'insuline, ainsi que par la diminution de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline (Chang & Halter, 2003 ; Cnop *et al.*, 2011). Le taux de prévalence du diabète augmente avec l'âge. En 2010, 133 enquêtes ont été menées dans 91 pays et ont permis de montrer que la prévalence du diabète auprès de populations adultes âgées de 20 à 79 ans varie selon la situation économique du pays. Ainsi, dans les pays industrialisés, les diabétiques sont majoritairement âgés de plus de 60 ans, alors qu'ils ont plutôt entre 40 et 60 ans dans les pays en voie de développement. Cette différence sera probablement encore présente en 2030, même si elle pourrait être moins marquée

(Figure 3). Le nombre de diabétiques dans le monde entier est susceptible d'augmenter jusqu'à 54% en 2030 en raison de la croissance démographique, du vieillissement des populations et du changement de style de vie associé à l'urbanisation (Shaw *et al.*, 2010).

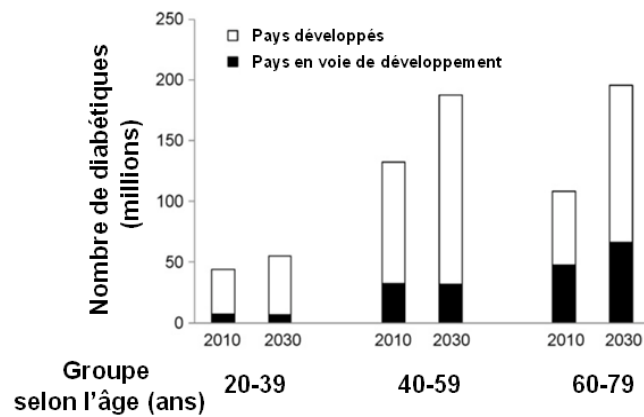


Figure 3 : Évolution du diabète dans les pays industrialisés et en voie de développement (d'après Shaw *et al.*, 2010)

b. Les cancers

Les cancers sont la première cause de décès dans les pays industrialisés et la deuxième dans les pays en voie de développement. Il existe une corrélation positive évidente entre l'âge et l'incidence des cancers. La prévalence du cancer ne cesse d'augmenter dans les pays industrialisés, principalement en raison du vieillissement de la population et du mode de vie incluant le tabagisme, la sédentarité et le régime alimentaire occidental. Dans ces pays, 78% des nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués à partir de 55 ans, alors que cette proportion chute à 58% dans les pays en voie de développement (American Cancer Society, 2011).

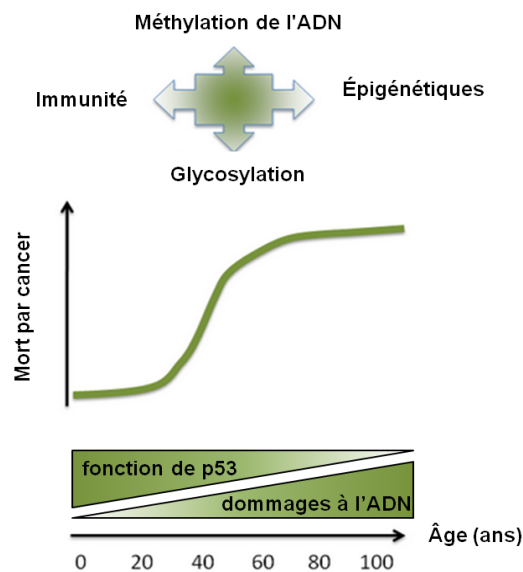


Figure 4 : Causes de l'augmentation de l'incidence du cancer (d'après Fulop *et al.*, 2011)

Augmentation des dommages à l'ADN et diminution de l'activité des gènes « gatekeepers » comme l'oncogène p53 au cours du vieillissement, accompagnée des modifications épigénétiques, y compris la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et la glycosylation, dans toutes les cellules et notamment les cellules immunitaires.

L'association avec le vieillissement peut s'expliquer de diverses façons (Figure 4) : la baisse de l'efficacité du système immunitaire qui réduit les capacités de combattre les anomalies (Fulop *et al.*, 2011), ainsi que l'installation de conditions pro-oxydantes qui favorisent l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créant des mutations potentielles de l'ADN et amplifiant les signaux de prolifération (Kryston *et al.*, 2011).

c. Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires constituent la deuxième cause de morbidité et de décès dans les pays industrialisés après le cancer, et l'âge est l'un des principaux facteurs de risque de leur développement (Figure 5). En fait, le vieillissement de l'organisme est associé à des modifications à la fois structurelles et fonctionnelles du cœur et de l'arbre vasculaire.

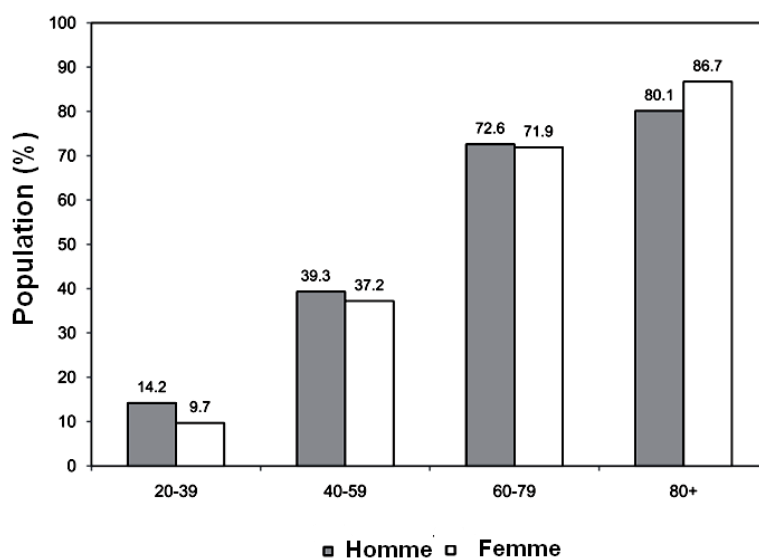


Figure 5 : Prévalence des maladies cardiovasculaires chez les adultes selon l'âge et le sexe (d'après Roger *et al.*, 2011)

L'infarctus du myocarde est une nécrose systématisée du muscle cardiaque, d'origine ischémique dans la majorité des cas, suite à une occlusion thrombotique aiguë d'une artère coronaire athéromateuse (Seeley *et al.*, 2003). Du fait de sa grande fréquence et de sa mortalité élevée, il occupe une place particulière parmi les maladies cardiovasculaires. Son incidence augmente avec l'âge, comme le montre le Tableau 1, mais elle dépend aussi du genre, comme l'ont observé Greenlee *et al.* (2002) dans leur étude sur la population générale (*Marshfield Epidemiological Study Area*, 1992-1998).

Tableau 1 : Incidence de l'infarctus du myocarde (d'après Greenlee *et al.*, 2002)

âge \ sexe	35-44 ans	45-54 ans	55-64 ans	65-74 ans	75-84 ans	≥85 ans
Homme	108,8	346,2	910	1581,6	2600,8	3039,5
Femme	29,9	123,9	259,5	777,2	1451,5	2154,8

Valeurs indiquées sur 100.000 personnes

L'insuffisance cardiaque est l'incapacité de la pompe cardiaque d'assurer dans des conditions physiologiques normales le débit sanguin nécessaire aux besoins métaboliques et fonctionnels des différents organes (Gourgou *et al.*, 1992). Son incidence est en constante augmentation dans les pays développés. Cette augmentation d'importance évolue parallèlement au vieillissement de la population.

L'accident vasculaire cérébral (AVC) désigne l'obstruction ou la rupture d'un vaisseau transportant le sang dans le cerveau, dont il résulte une privation d'oxygène (Seeley *et al.*, 2003). Les AVC représentent la troisième cause de mortalité en France, la deuxième cause de démence et la première cause de handicap acquis de l'adulte (Bouteloup & Ferrier, 2011).

d. Les maladies neurodégénératives

i. La maladie d'Alzheimer

Le vieillissement est le facteur de risque principal de la MA (Launer *et al.*, 1999). D'après une étude récente portant sur des personnes très âgées, le taux d'incidence de la démence augmente de 5,5% par an chez les personnes âgées de 65 à 90 ans, de 12,7% par an de 90 à 94 ans, de 21,2% par an de 95 à 99 ans, pour atteindre 40,7% par an chez les âgés de plus de 100 ans (James & Schneider, 2010).

ii. La maladie de Parkinson

C'est l'affection neurodégénérative progressive la plus fréquente après la MA. Elle affecte principalement les mouvements volontaires et contrôlés. Elle résulte de la destruction, dans une partie du cerveau appelée substance noire, de neurones chargés de produire un neurotransmetteur chimique, la dopamine, impliqué dans le contrôle et la volonté des mouvements du corps. Le patient présente des symptômes psychiatriques comme l'anxiété et la dépression et des symptômes dysautonomiques tels que l'hypotension et la constipation, des paresthésies, des crampes, des troubles olfactifs et une dermatite séborrhéique. Des troubles cognitifs accompagnent la progression de la maladie. Comme la MA, l'âge est le facteur de risque principal de la MP (Tableau 2). Plus de 200 enquêtes dans de nombreux pays ont permis de conclure que la prévalence de cette maladie est fortement liée à l'âge (Wirdefeldt *et al.*, 2011).

**Tableau 2 : Prévalence de la maladie de Parkinson en France et aux États-Unis
(d'après Wirdefeldt *et al.*, 2011)**

France	groupe d'âge (an)	65–69	70–74	75–79	80–84	85–89	>90
	Prévalence/100.000 personnes	500	200	1.800	2.200	2.200	6.100
États-Unis	groupe d'âge (an)	60–69	70–79		80–89		>90
	Prévalence/100.000 personnes	1.515	8.235		12.820		16.666

3. Facteurs de risque de vieillissement pathologique

Plusieurs facteurs peuvent moduler les effets du vieillissement, retardant ou au contraire accélérant les processus délétères et dysfonctionnements qui s'accumulent avec l'âge. Cette partie contextualise spécifiquement les altérations du système nerveux central et leurs impacts cognitifs et fonctionnels.

a. Facteurs environnementaux : exposition à des toxiques

En raison de ses caractéristiques cyto-architectoniques, qui éloignent le corps cellulaire (soma) et les terminaisons des neurones, et métaboliques, qui font de lui un grand consommateur d'oxygène et d'énergie, le système nerveux central (SNC) présente une vulnérabilité particulière aux xénobiotiques, comme les produits chimiques et pharmaceutiques ou les polluants dans l'environnement. Le SNC est considéré par conséquent comme une cible majeure où s'exerce la toxicité systémique (van Thriel *et al.*, 2011). Cette sensibilité est très élevée pour le SNC au cours de développement. Or, le développement du SNC commence tôt dans la vie embryonnaire et s'achève bien après la naissance (jusqu'à plusieurs années). Pendant la vie intra-utérine, le SNC se développe d'une façon très rigoureuse, permettant les interconnexions des neurones entre eux. La chronologie ultra précise des étapes de prolifération, migration, différenciation, synaptogenèse/gliogenèse, myélinisation et apoptose définit des fenêtres de susceptibilité pour l'interférence d'un composé toxique, même en très faible concentration, ne laissant guère de possibilité de réparation ultérieure, si bien que certaines perturbations induites tôt par un agent toxique provoquent parfois une cascade d'altérations dont les effets peuvent se révéler beaucoup plus tard dans la vie (Rice & Barone, 2000).

De nombreux agents environnementaux peuvent altérer la prolifération, la migration et la différenciation neuronale et gliale. Ainsi, des études ont montré une altération des processus du développement en conséquence de l'administration, lors de fenêtres de temps critiques, d'agents antimitotiques comme les rayonnements ionisants, le méthylazoxyméthanol, les métaux lourds (Pb, Al, Me-Hg,...), l'éthanol, le tabagisme maternel et les polychlorobiphényles (PCB), sans doute en conséquence de la propriété de ces composés à perturber la synaptogenèse (Rice & Barone, 2000 ; Roegge *et al.*, 2006 ; Fox *et al.*, 2010). En général, les trois premières semaines du développement postnatal du SNC chez les rongeurs présentent la période vulnérable de ces agents (Rice & Barone, 2000). Bien que l'apoptose soit un processus physiologiquement requis lors du développement du SNC, c'est sa stimulation anormale de l'apoptose qui semble résulter de l'exposition aux agents neurotoxiques

environnementaux. Ceux-ci, administrés en période critique, pourraient aussi perturber l'équilibre finement contrôlé des signaux neurotrophiques qui régulent l'apoptose, provoquant ainsi des altérations indésirables de la densité cellulaire dans les différentes régions du SNC (Rice & Barone, 2000).

Ainsi, l'exposition aux polluants organiques persistants ou POP, substances organiques lipophiles très toxiques (Schell *et al.*, 2006), a été rapportée capable d'altérer différents systèmes tels que le SNC, et les systèmes endocrinien, reproductif, cardiovasculaire et immunitaire (Gilbert & Grant-Webster, 1995 ; Darras, 2008 ; Majkova *et al.*, 2008 ; Fox *et al.*, 2010 ; Schell & Gallo, 2010). D'autres études ont montré que les POP peuvent déclencher le développement de plusieurs types de cancers, et même être impliqués dans la survenue de diabète, de surpoids et d'obésité (Schell *et al.*, 2010; La Merrill & Birnbaum, 2011). Il est utile de préciser ici que les populations humaines peuvent être contaminées par ces polluants lors d'une exposition professionnelle d'origine industrielle ou agricole, mais aussi voie cutanée, inhalation et surtout par ingestion de produits animaux et végétaux dans lesquels ils s'accumulent. Les POP se retrouvent donc dans la chaîne alimentaire, les fœtus et les nourrissons pouvant eux aussi être exposés par la voie placentaire et par l'allaitement (Schell *et al.*, 2006).

Parmi les POP, les polychlorobiphényles ou PCB (Figure 6) ont été largement décrits dans la littérature. Ils représentent une famille de 209 congénères parmi lesquels la dioxine et de nombreux insecticides et pesticides. Les PCB pénétrant par voie alimentaire sont absorbés par le tractus digestif, distribués par le sang dans l'ensemble de l'organisme, et accumulés préférentiellement dans les tissus riches en lipides comme les tissus nerveux et adipeux. Chez les mammifères, le lait représente également une voie d'élimination, induisant à la contamination du nourrisson (Cravedi & Narbonne, 2002).

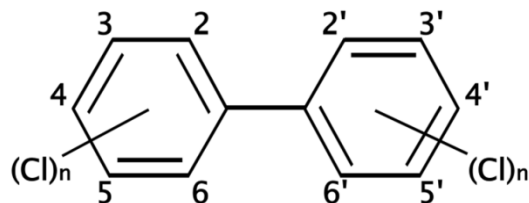


Figure 6 : Formule chimique de base des PCB

De nombreux effets toxiques liés aux PCB ont été rapportés par des études *in vitro* et *in vivo* au niveau endocrinien, métabolique, immunologique, reproducteur, hépatique, gastro-intestinal, hématologique et cutané, ainsi qu'au niveau du SNC. Ainsi, des études épidémiologiques sur des populations humaines ont démontré qu'une exposition prénatale aux PCB est associée à des effets néfastes sur le neurodéveloppement et le neurocomportement. Cette exposition provoque une diminution de l'attention, de la mémoire et des capacités d'apprentissage (Newman *et al.*, 2006), ainsi qu'une altération cognitive et motrice (Vreugdenhil *et al.*, 2002) et des capacités intellectuelles sensiblement plus faibles (Jacobson & Jacobson, 1996 ; Stewart *et al.*, 2012).

b. Alimentation et habitudes de vie

D'une manière générale, l'apport alimentaire et l'apport énergétique diminuent avec l'âge. Les grandes études épidémiologiques ont en effet montré qu'environ 4% des personnes âgées théoriquement en bonne santé qui vivent à domicile sont dénutries (Hébuterne, 2006). Or, la dénutrition est un critère déterminant, cause de fragilité. Elle est responsable de carences en vitamines, minéraux, oligoéléments, acides aminés, acides gras et autres éléments indispensables à l'organisme. Cette dénutrition est due à plusieurs facteurs physiologiques et non physiologiques qui conduisent à une perte d'appétit qui s'avère déterminante dans le processus de vieillissement (Hays & Roberts, 2006) :

- Facteurs physiologiques : modifications sensorielles, du goût et de l'odorat en particulier, liées à l'âge, diminution de la satiété sensorielle spécifique, retard de la vidange gastrique et perturbation de la sécrétion des hormones liées à la digestion.
- Facteurs non physiologiques : sociaux (deuil, isolement, difficultés financières, maltraitance, etc.), psychologiques (dépression, alcoolisme, démence, etc.), médicaux (problèmes dentaires et de mastication, dysphagie, douleur, maladie chronique, intervention chirurgicale, etc.) et pharmacologiques (médicaments pris à long terme).

c. Stress oxydant

Les processus de vieillissement cellulaire sont étroitement liés à un déséquilibre de la balance pro vs. antioxydants qui s'installe progressivement avec l'âge en relation avec une hyperproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et une baisse des défenses antioxydantes (Dröge, 2002). Plusieurs études mettent en évidence une augmentation des paramètres de mesure du stress oxydant chez le sujet âgé et une baisse de ses défenses antioxydantes, particulièrement dans les cellules post-mitotiques où les cellules ne contrôlent plus la présence excessive des ERO (Andriollo-Sanchez *et al.*, 2005 ; Sohal & Orr, 2012). Les ERO sont produits par un grand nombre de mécanismes tant endogènes qu'exogènes. Les sources exogènes peuvent être présentées par des facteurs environnementaux. En effet, la pollution, certains produits chimiques, l'exposition prolongée au soleil, le tabagisme, ainsi que des contaminations par des métaux lourds ou certaines carences nutritionnelles sont d'autant de situations qui peuvent induire une surproduction d'ERO susceptible de dépasser le niveau de défenses naturelles, particulièrement chez les personnes âgées. Les sources endogènes des ERO se situent au niveau de la chaîne mitochondriale, du cytochrome P450, de l'enzyme NADPH oxydase, des peroxysomes et de l'activation de cellules inflammatoires (Curtin *et al.*, 2002 ; Khansari *et al.*, 2009). À des niveaux physiologiques, les ERO sont indispensables pour l'organisme où ils remplissent de très nombreuses fonctions essentielles, telles que la régulation de l'apoptose des cellules susceptibles d'évoluer vers un état cancéreux, l'activation de facteurs de transcription responsables de l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (NF- κ B, p38-MAP kinase,...), la modification de l'expression de gènes des enzymes de défense antioxydante et la stimulation de la prolifération

cellulaire (Palmer & Paulson, 1997 ; Curtin *et al.*, 2002 ; Dröge, 2002 ; Duracková, 2010). Mais la production excessive d'ERO provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation des lipides, protéines, acides nucléiques et glucides), et des lésions indirectes dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides (Beckman & Ames, 1998). Ces effets se traduisent par l'augmentation de l'incidence de pathologies comme les cancers et les maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives (Khansari *et al.*, 2009).

Les lipides membranaires, principalement leurs acides gras polyinsaturés (AGPI), sont les cibles privilégiées du radical hydroxyle (OH•). Ce dernier est capable d'arracher un hydrogène appelé *bis*-allylique attaché sur les carbones intermédiaires, situés entre deux doubles liaisons ($-C=C-$), pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. L'hydrogène *bis*-allylique est susceptible de subir cette attaque car il a l'énergie la plus basse de l'acide gras (AG), et plus le nombre d'hydrogènes *bis*-allyliques augmente, plus cet acide est susceptible à l'attaque oxydante (Hulbert, 2010). Cette réaction, appelée peroxydation lipidique, implique une réaction en chaîne, le radical peroxy ainsi formé se transformant en peroxyde au contact d'un autre AG qui forme un nouveau radical diène conjugué. Les aldéhydes générés en conséquence (4-hydroxy-2-nonéanal, malonaldéhyde, acroléine) sont très réactifs vis-à-vis des autres molécules biologiques. La peroxydation lipidique en chaîne altère les propriétés physicochimiques et fonctionnelles des membranes, portant préjudice à la fonction de nombreux récepteurs et transporteurs membranaires, ainsi qu'à la transduction des signaux.

De toute évidence, le SNC est particulièrement plus sensible aux ERO, en raison de sa richesse en AGPI et de ses besoins métaboliques élevés en oxygène, ainsi que de ses concentrations relativement faibles en antioxydants (Slivka *et al.*, 1987 ; Reiter, 1995 ; Floyd & Hensley, 2002). En effet, le taux de dommages à l'ADN par les ERO est très élevé, estimé en moyenne à plus de 10.000 attaques oxydantes de l'ADN chaque jour dans une cellule humaine. Bien que les systèmes de réparation cellulaire corrigent une grande partie de ces dommages, les lésions induites dans l'ADN s'accumulent avec l'âge, ce qui semble être un processus étiologique important lié au vieillissement (Khansari *et al.*, 2009). Outre les aberrations affectant le génome nucléaire, les ERO attaquent aussi l'ADN mitochondrial (ADNmt), bien plus sensible encore en raison surtout de sa proximité avec la chaîne respiratoire (Cadenas & Davies, 2000). Différentes études ont montré que les modifications de l'ADNmt augmentent avec l'âge chez les mammifères, spécialement dans les cellules post-mitotiques telles que les neurones et les muscles qui ont une demande énergétique élevée (Lin & Beal, 2006). De plus, la phosphorylation oxydante subit des perturbations et l'énergie mitochondriale fournie se réduit, fragilisant les organes exigeants en ATP et doués de capacités régénératrices faibles comme le SNC, le cœur, les muscles squelettiques, l'œil, le rein ou le pancréas (Wallace, 1994), ce qui peut conduire aux diverses maladies liées au vieillissement. Enfin, l'exposition accrue aux ERO peut aussi exacerber des processus apoptotiques par l'ouverture des pores de perméabilité transitoire mitochondriaux. Ceci provoque le relargage de cytochrome *c* et d'autres molécules capables de promouvoir l'apoptose par des voies de

signalisation dépendantes ou non des caspases (Seo *et al.*, 2010) et induisant le clivage internucléosomique de la chromatine (Green & Reed, 1998 ; Susin *et al.*, 1999).

Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases, en particulier du protéasome. Si elles ne sont pas éliminées, ces protéines deviennent dangereuses pour la cellule dont elles menacent l'homéostasie métabolique (Sultana *et al.*, 2012). L'oxydation des enzymes menant à des perturbations métaboliques, l'inactivation des protéases peut altérer l'élimination des protéines oxydées qui peuvent alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuscine caractéristiques des tissus des sujets âgés (Merker *et al.*, 2001 ; Brunk & Terman, 2002). De nombreuses recherches ont montré l'augmentation avec l'âge des dommages oxydants sur les protéines mesurés par les protéines carbonylées (Stadtman, 1992 ; Merker *et al.*, 2001 ; Venkateshappa *et al.*, 2012) qui s'accumulent chez l'homme surtout dans les fibroblastes (Oliver *et al.*, 1987), le cerveau (Smith *et al.*, 1991 ; Perluigi *et al.*, 2010) et les muscles squelettiques (Mecocci *et al.*, 1999). Cette accumulation des protéines oxydées avec l'âge peut s'expliquer par l'augmentation des taux d'oxydation des protéines et/ou par la diminution des capacités d'élimination des protéines oxydées (Stadtman, 1992).

L'organisme dispose de systèmes de protection antioxydante efficaces contre les ERO produits à niveaux physiologiques (Figure 7). Ces systèmes de défense incluent des composantes endogènes et exogènes.

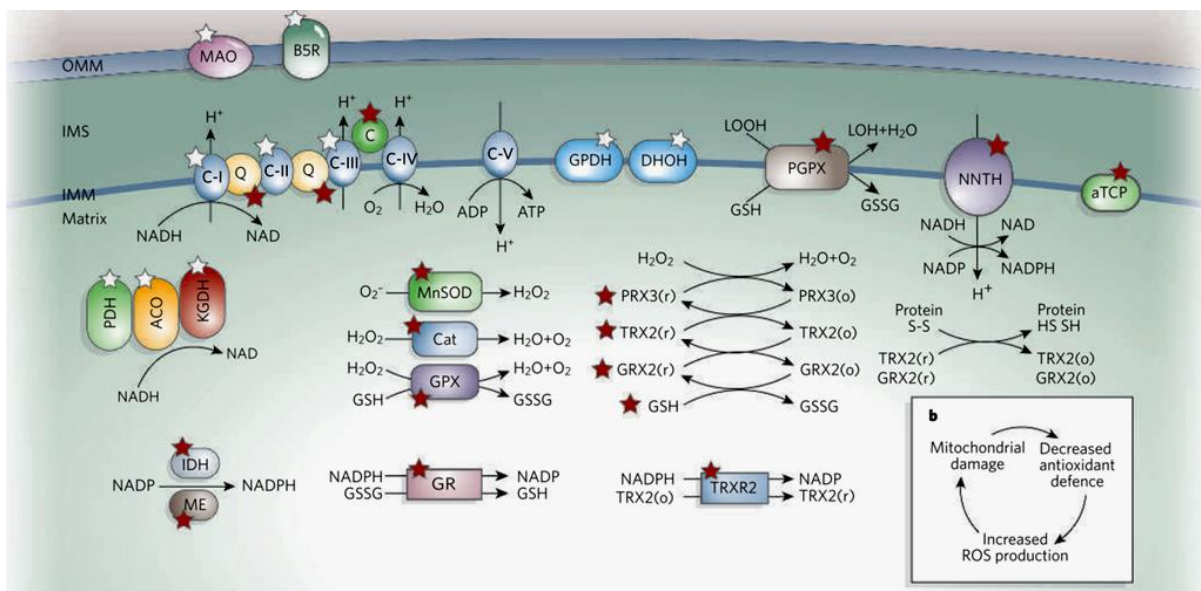


Figure 7 : Principales étapes du métabolisme mitochondrial des ERO (d'après Lin & Beal, 2006)

Les processus et les composés impliqués dans la génération d'ERO sont marqués d'une étoile blanche, tandis que les systèmes antioxydants le sont d'une étoile rouge. Les mitochondries sont les consommateurs principaux de l'oxygène et les sièges principaux de libération d'ERO. Elles contiennent de nombreuses enzymes capables de transférer des électrons célibataires à l'oxygène, générant ainsi le radical superoxyde ($O_2\bullet$). Parmi ces enzymes, les enzymes du cycle de Krebs comme l'aconitase (ACO) et le complexe α -cétoglutarate déshydrogénase (KGDH), les complexes de la chaîne de transport d'électrons I, II et III, la pyruvate déshydrogénase (PDH), la glycérol 3-phosphate déshydrogénase

(GPDH), la dihydroorotate déshydrogénase (DHOH), les monoamine oxydases (MAO) et enfin la cytochrome b5 réductase (B5R). Les mitochondries contiennent également des systèmes de défense antioxydante impliqués dans les réactions de détoxification des ERO décrites ci-dessus. Le système de défense enzymatique inclut les enzymes superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD), catalase (Cat), glutathion peroxydase (GPX), phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase (PGPX), glutathion réductase (GR), peroxyrédoxines (PRX3/5), glutarédoxines (GRX2), thiorédoxine (TRX2), et thiorédoxine réductase (TRXR2). Le glutathion (GSH), l' α -tocophérol (aTCP) et le coenzyme Q10 (Q) représentent les principales défenses antioxydantes non enzymatiques. La régénération du glutathion et de la thiorédoxine repose sur des réductases spécifiques dont l'activité repose sur la disponibilité du NADPH, cofacteur produit par les isocitrate déshydrogénases (IDH), l'enzyme malique (ME) ou la nicotinamide nucléotide transhydrogénase (NNTH). Dans les conditions pathologiques, une rupture d'équilibre entre les capacités cellulaires de défense antioxydante et les taux de génération des ERO, rendant donc de fait les mitochondries davantage susceptibles.

Les systèmes antioxydants endogènes peuvent être de nature enzymatique, incluant :

- les superoxydes dismutases (SOD), capables d'éliminer l'anion superoxyde par dismutation du radical en H_2O_2 et en OH^+ et OH^- ;
- les catalases et les glutathion peroxydases (GPx), les principales enzymes capables de réduire le peroxyde d'hydrogène en libérant de l'oxygène et de l'eau. Les GPx sont quantitativement plus efficaces que les catalases, tandis que d'autres systèmes enzymatiques comme les glutathion S-transférases (GST) assurent des activités peroxydasiques spécifiques (Fang *et al.*, 2002).

Les systèmes antioxydants de nature non enzymatique (scavengers) sont essentiellement cytosoliques. Il s'agit surtout du glutathion réduit (GSH) qui intervient seul ou associé à des enzymes pour réduire les peroxydes. Le glutathion sous forme de disulfure (GSSG) peut normalement être régénéré en GSH par la glutathion réductase, enzyme NADPH-dépendante couplée métaboliquement à la glucose-6-phosphate déshydrogénase pour l'apport en cofacteur (Curtin *et al.*, 2002).

Les antioxydants exogènes sont très majoritairement apportés par l'alimentation. Les piègeurs de radicaux libres incluent la vitamine E (tocophérol) et les caroténoïdes tels que le β -carotène parmi les lipophiles, ainsi que la vitamine C (acide ascorbique) comme scavenger hydrophile. Ces molécules agissent en piégeant les radicaux libres et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. La vitamine devenue radicalaire est alors détruite ou régénérée par un autre système. De très nombreux autres composés alimentaires peuvent aussi présenter des propriétés antioxydantes, parmi lesquels les polyphénols et les AGPI *n*-3, capables de stimuler l'expression de protéines antioxydantes (SOD, GST) et d'inhiber celle d'iNOS, la NO (oxyde nitrique) synthase inductible (Fang *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2012).

Les recherches menées au cours des dernières années ont montré qu'un grand nombre de pathologies, parmi lesquelles le cancer, les maladies cardiovasculaires, les démences ainsi que le déclin de la fonction immunitaire, seraient favorisées par une production d'ERO surpassant les capacités de défense antioxydantes, situation conduisant alors au stress oxydant. Au cours du vieillissement, ce déséquilibre est accru en cas de pathologies (Figure 7). Ainsi, différents travaux ont montré une diminution avec l'âge de l'activité de la catalase et de la GPx. L'augmentation du stress oxydant chez le

sujet âgé, objectivée par une baisse des enzymes antioxydantes et une augmentation de la peroxydation lipidique, est bien documentée et corrélée à une baisse des apports, alors que les besoins augmentent pour faire face aux pathologies oxydantes (Sohal & Weindruch, 1996). Ainsi, une étude a mis en évidence une augmentation importante du stress oxydant chez les Américaines de plus de 50 ans en comparaison à des femmes plus jeunes (Trevisan *et al.*, 2001). De même, il a été rapporté au cours du vieillissement normal chez l'homme une nette augmentation de l'oxydation des protéines (Figure 8) associée à une diminution significative du glutathion réduit, ainsi qu'à une baisse des défenses antioxydantes enzymatiques (SOD, catalase, thiorédoxine réductase, glutathion réductase et glutathion *S*-transférase) dans l'hippocampe et le cortex frontal (Venkateshappa *et al.*, 2012). Ainsi, chez le sujet sain vieillissant, le déséquilibre de la balance pro/antioxydant s'installe progressivement, en relation avec une baisse des défenses antioxydantes. L'âge, la malnutrition et la survenue de pathologies peuvent aggraver ce déséquilibre et accélérer les processus concourant au stress oxydant.

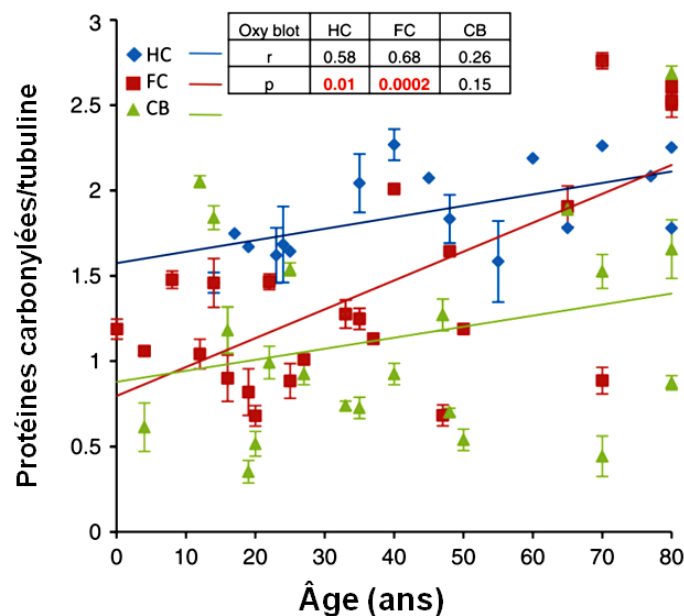


Figure 8 : Évolution de l'oxydation des protéines du cerveau chez l'homme (d'après Venkateshappa *et al.*, 2012)

Le niveau des dommages oxydants des protéines cérébrales a été quantifié dans l'hippocampe (HC, n=17), le cortex frontal (FC, n=24) et le cervelet (CB, n=10). Une nette augmentation de l'oxydation protéique avec l'âge a été rapportée dans l'hippocampe et le cortex frontal, non significative dans le cervelet.

d. Traumatismes crâniens

Le traumatisme crânien (TC) désigne toute atteinte cérébrale impliquant une destruction ou un dysfonctionnement du tissu cérébral suite à un choc entre le cerveau et la boîte crânienne, entraînant parfois des complications liées à des lésions de l'encéphale. Il déclenche alors une cascade neuro-inflammatoire complexe entraînant en conséquence la libération d'excitotoxines, de protéases, ainsi que d'espèces réactives oxygénées et azotées. Certes, la réponse cérébrale au TC engage plutôt un processus adaptatif visant à éliminer les cellules des régions endommagées. Mais l'activation excessive des cellules

gliales induit un stress métabolique et oxydant qui peut compromettre l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et favoriser en conséquence le développement d'un œdème cérébral et d'une hypertension intracrânienne. Ces perturbations sont fréquemment accompagnées par des difficultés d'apprentissage et de concentration, des pertes mnésiques, des troubles de la motricité fine et du jugement, ce qui peut altérer la qualité de vie à long terme (Laskowitz *et al.*, 2010). Des études montrent aussi que les TC augmenteraient le risque de troubles cognitifs et de démence. Plassman *et al.* (2000) révèlent que les TC survenus à l'âge adulte semblent associés à un risque accru de maladie d'Alzheimer et à l'apparition d'autres démences au cours du vieillissement. L'analyse des dossiers médicaux de 281.540 vétérans américains âgés de 55 ans et plus et chez qui la démence n'avait pas été diagnostiquée au début de l'étude, a montré que les vétérans atteints d'une lésion cérébrale présentaient un risque de 15,3% de développer une démence pendant les 7 ans qu'a duré l'étude, soit plus du double par rapport aux autres vétérans (6,8%) (Yaffe *et al.*, 2010).

e. Facteurs socio-économiques

L'état de santé a donc bien tendance à se détériorer au cours du vieillissement de tous les individus, avec une variabilité entre chacun qui repose sur les différents paramètres protecteurs ou aggravants évoqués ci-dessus. Cependant, des études longitudinales relatives à l'influence du statut socio-économique rapportent une corrélation entre l'état de santé d'une personne et sa classe sociale. Le déclin de la santé liée à l'âge pourrait donc faire l'objet d'une inégalité sociale. Dans la population britannique, les données transversales indiquent que la prévalence des maladies chez des personnes âgées de 50 ans et plus est supérieure chez les travailleurs manuels ou ceux exerçant une profession « routinière » par rapport aux catégories socioprofessionnelles plus élevées (Marmot *et al.*, 2003). De plus, la santé physique est apparue se détériorer plus rapidement avec l'âge chez les individus du groupe social défavorisé, alors que le taux d'amélioration de la santé mentale au cours de vieillissement est plus lent (Figure 9). L'ensemble de ces résultats pourrait signifier que les groupes sociaux défavorisés vieillissent, en termes de déclin de santé, plus vite par rapport aux autres groupes professionnels (Chandola *et al.*, 2007).

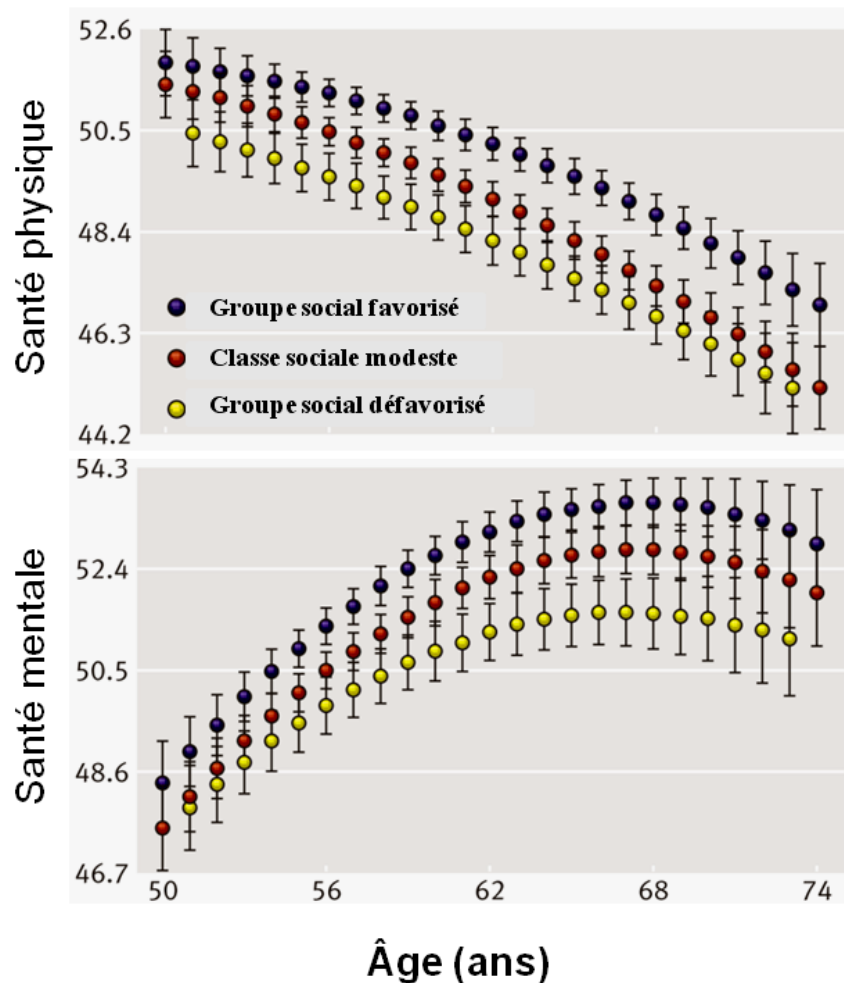


Figure 9 : Influence de la classe sociale sur la santé physique et mentale au cours du vieillissement (d'après Chandola *et al.*, 2007)

f. Réserve cognitive : stimulation intellectuelle / niveau d'études

L'absence de manifestations cliniques malgré l'atteinte cérébrale observée chez certains patients a fait émerger le concept de « réserve », défini comme la quantité de détérioration physiologique qui peut être supportée avant d'atteindre un seuil critique, à partir duquel des signes cliniques vont se manifester (Stern, 2002). Les processus conduisant à la formation de cette réserve est encore mal connu. Cependant, deux hypothèses ont été proposées comme substrat neurocognitif (Stern, 2009) :

- le modèle passif de « **réserve cérébrale** » : il propose que le seuil critique, identique chez tous les individus, dépende de diverses propriétés neurophysiologiques, comme l'expérience de vie et le nombre de neurones et de synapses ou le volume cérébral (Figure 10a).

- le modèle actif de « **réserve cognitive** » : il propose que la variabilité interindividuelle dans la capacité à optimiser les performances s'appuie soit sur la plasticité neuronale, *i.e.* « une différence d'efficacité et/ou de flexibilité d'un réseau neurocognitif préexistant et spécifique à la réalisation d'une tâche cognitive donnée », soit sur la compensation neuronale, *i.e.* « la capacité de certains réseaux à compenser la défaillance d'autres en conséquence du vieillissement ou de pathologies » (Figure 10b).

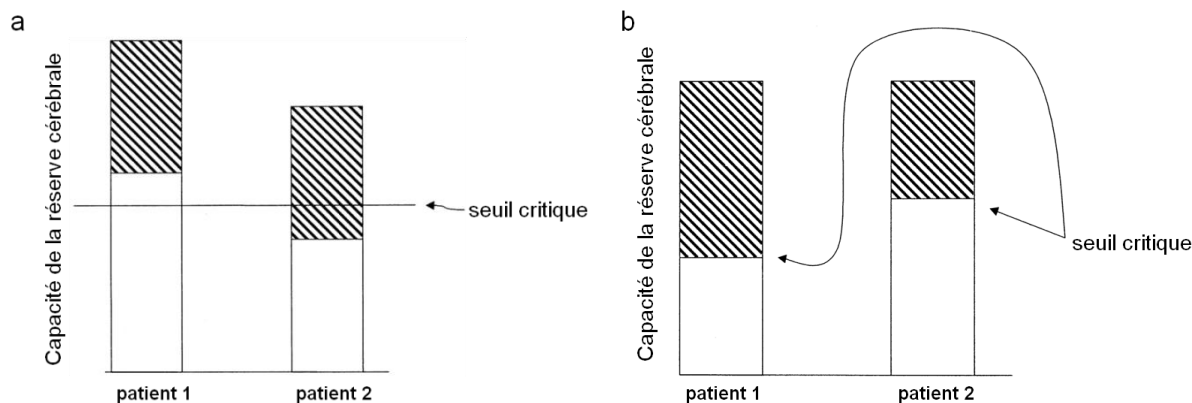


Figure 10 : Hypothèses de la formation de réserve cognitive (d'après Stern, 2002)

a) Modèle passif de « réserve cérébrale » Une lésion particulière provoque un déficit cognitif chez le patient 2 ayant une moindre capacité de réserve cérébrale (CRC) qui passe sous le seuil critique. Inversement, la même lésion n'a pas d'effet sur le patient 1 bénéficiant d'une CRC plus élevée. **b) Modèle actif de « réserve cognitive »** Deux patients ont une même CRC, mais le patient 1 dispose de plus de réserve cognitive que le patient 2 en raison de mécanismes de traitement plus efficaces. En conséquence, le patient 1 peut tolérer des lésions cérébrales plus importantes que le patient 2 avant que n'apparaisse un déficit cognitif fonctionnel.

Plusieurs facteurs pourraient influencer la réserve cognitive (RC), comme la stimulation intellectuelle, le niveau d'études, le quotient intellectuel (QI), le niveau occupationnel et les activités de loisirs (Stern, 2009 ; Steffener & Stern, 2012). Parmi ces facteurs, la stimulation intellectuelle et l'éducation ont été les plus étudiés. Une grande étude interventionnelle appelée ACTIVE (*Advanced Cognitive Training for Independent and Vital Elderly*) a évalué les effets de la stimulation intellectuelle sur 2.832 sujets âgés de 65 à 94 ans vivant à leur domicile et sans perte d'autonomie. Les sujets ont été répartis aléatoirement dans 4 groupes : un groupe contrôle (n=704), et 3 groupes intervention avec un type d'intervention différente pour chacun. Les interventions consistaient à suivre un programme de 10 séances d'entraînement cognitif de 60 à 75 min pendant 6 semaines. Dans un groupe, il s'agissait d'exercices de mémoire (n=711). Dans un autre, l'entraînement portait sur le raisonnement et la capacité de résoudre des problèmes simples et complexes (n=705). Dans le troisième, l'entraînement visait à améliorer l'attention et la rapidité de réaction (n=712). Les tests d'évaluation ont été réalisés au départ de l'étude, peu après l'entraînement, puis 1 et 2 ans après. Chaque type d'intervention a produit des effets significatifs en améliorant les capacités cognitives qui lui correspondaient. L'effet maximal était observé lors de l'évaluation faite peu après l'entraînement (87% de sujets améliorés dans le groupe rapidité, 74% dans le groupe raisonnement, et 26% dans le groupe mémoire), mais les effets significatifs étaient encore observés 1 et 2 ans après (Ball *et al.*, 2002). Cette étude montre clairement que la stimulation intellectuelle peut améliorer les fonctions cognitives, en empêchant ou même en réversant le déclin cognitif induit par le vieillissement cérébral. Ces effets bénéfiques pourraient être maintenus sur le long terme, pendant au moins 2 ans.

Pour montrer l'effet de l'éducation sur la RC, Fratiglioni & Wang (2007) ont comparé les résultats de 23 études épidémiologiques (12 transversales et 11 longitudinales). Dans 21 d'entre elles, un faible niveau d'étude a été associé à un risque accru de démence ou de MA. D'autres études du vieillissement normal ont rapporté un lien entre le fonctionnement intellectuel élevé et la réduction du déclin cognitif et fonctionnel chez les personnes âgées. Ceci suggère que les facteurs liés à l'éducation, susceptibles de retarder l'apparition de démence, sont eux-mêmes capables de préserver efficacement les capacités cérébrales au cours du vieillissement (Stern, 2006).

g. Activités physiques

L'un des facteurs comportementaux impliqués dans le maintien ou l'amélioration de multiples aspects du fonctionnement physique ou psychologique de la personne âgée est la pratique d'activités physiques (AP). Cette activité est définie comme « tout mouvement du corps produit par la contraction des muscles squelettiques capable d'augmenter substantiellement la dépense énergétique au-delà de la dépense de repos » (Thompson *et al.*, 2003). L'effet modérateur de l'AP sur le vieillissement cérébral pathologique et non pathologique a été étudié chez l'homme et chez l'animal à l'aide de différents protocoles : études épidémiologiques longitudinales, transversales et interventionnelles (Churchill *et al.*, 2002 ; Graff-Radford, 2011).

Les études épidémiologiques longitudinales ont montré que l'activité physique permet de diminuer le risque d'apparition des maladies neurodégénératives et de ralentir les effets délétères de l'âge sur les fonctions cognitives. L'une de ces études, réalisée aux États-Unis durant 9 ans sur un échantillon de 1.740 personnes âgées de plus de 65 ans en bonne santé cognitive au départ de l'étude, a montré un taux de démence de 13 pour 1.000 personnes-années chez les personnes qui pratiquent une AP au moins 3 fois par semaine, soit un taux moins élevé (19,7%) que celui des personnes qui pratiquent moins de 3 fois par semaine (Larson *et al.*, 2006). Une autre étude, réalisée au Canada durant 5 ans sur une population de 4.615 personnes âgées de plus de 65 ans, a montré qu'une AP régulière pouvait être considérée comme un facteur protecteur contre la maladie d'Alzheimer en diminuant le risque de 31% (Lindsay *et al.*, 2002). Yaffe *et al.* (2001) ont examiné l'évolution pendant 6 à 8 ans des capacités cognitives de 5.925 femmes âgées de 65 ans et plus en fonction de leur niveau de pratique régulière d'AP mesuré par la distance de marche parcourue chaque jour. Les résultats ont révélé que les femmes qui marchaient moins de 1,12 km/semaine et/ou dépensaient moins de 336 kcal/semaine lors d'AP subissaient un déclin cognitif de 24%. En revanche, celles qui marchaient en moyenne 28 km/semaine et/ou dépensaient en moyenne 3.469 kcal/semaine accusaient un déclin cognitif de seulement 16,6%. Enfin, l'étude FINE (*Finland, Italy, and the Netherlands Elderly*) réalisée sur une durée de 10 ans dans trois pays européens a montré que les fonctions cognitives de 295 personnes âgées de plus de 70 ans ont significativement décliné chez les personnes qui ont diminué leur volume journalier d'activité physique, alors qu'elles sont stables chez ceux qui l'ont augmenté (van Gelder *et al.*, 2004).

Les études transversales aussi indiquent l'existence d'une corrélation positive entre le niveau d'AP et la santé cérébrale ainsi que les performances cognitives. Spirduso (1975) a été le premier à mettre en évidence une plus grande rapidité d'exécution des personnes âgées pratiquant régulièrement une AP sur leurs homologues inactifs. Les groupes de participants actifs incluaient des hommes qui jouaient au squash, au racquetball ou au handball un minimum de 3 fois par semaine depuis 30 ans pour les participants âgés ou depuis 2 à 3 ans pour les participants jeunes. Les groupes de participants inactifs incluaient des hommes n'ayant jamais participé à aucune activité sportive régulière. La tâche des participants consistait à réagir le plus rapidement possible à l'apparition d'un stimulus lumineux en appuyant sur un interrupteur. Les résultats obtenus ont montré que les participants actifs réagissaient plus rapidement à l'apparition du stimulus et appuyaient sur l'interrupteur plus vite que leurs homologues inactifs. Depuis, d'autres études ont été reproduites avec d'autres types d'AP et leurs résultats montrent un effet significatif de l'AP sur la performance cognitive des personnes âgées. Une étude récente a ainsi démontré que les femmes ayant une AP régulière à n'importe quel moment de leur vie, surtout lors de l'adolescence, ont un risque moindre de déclin cognitif avec l'âge par rapport aux femmes inactives (Middleton *et al.*, 2010).

Les études interventionnelles présentent des arguments convaincants en faveur d'une influence positive et effective de l'exercice chronique sur le vieillissement cérébral et cognitif. Citons par exemple l'essai contrôlé randomisé de 120 personnes âgées en moyenne de 66,6 ans, montrant qu'une AP aérobie d'une durée de 10 à 40 min, à raison de 3 fois par semaine pendant un an, entraîne une augmentation du volume de l'hippocampe de 2 % associée à une amélioration des performances de la mémoire spatiale. Cette modification a également été associée à un niveau plus élevé de BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) plasmatique (Erickson *et al.*, 2011).

Plusieurs études menées chez l'animal ont visé à déterminer les mécanismes neurophysiologiques qui sous-tendent les effets observés chez l'homme, livrant un certain nombre de constatations. Ainsi, sous l'influence de nouvelles expériences sensorielles et motrices liées à la pratique d'AP, le réseau de connectivité cérébral peut se modifier en créant de nouvelles connexions (synaptogenèse) ou en renforçant l'efficacité de la transmission synaptique de certaines connexions. Ce réseau améliore également la potentialisation à long terme et augmente le niveau de protéines synaptiques, les récepteurs du glutamate et la disponibilité des facteurs de croissance. Il a par ailleurs été montré que l'AP augmente le niveau de BDNF hippocampique et stimule la neurogenèse, les nouveaux neurones parvenant alors à s'intégrer dans des réseaux de connectivité tout à fait fonctionnels (Cotman *et al.*, 2007 ; Foster *et al.*, 2011).

Dans l'ensemble, il apparaît que le maintien d'un style de vie physiquement actif tout au long de sa vie ou la prise d'une activité physique régulière entraînent un maintien ou une amélioration du fonctionnement cognitif des personnes âgées.

4. Effets du vieillissement

a. Sur le métabolisme

La composition corporelle de l'organisme se modifie au cours du vieillissement, consistant chez l'homme, à poids constant, en une réduction de la masse maigre (protéines) et une majoration proportionnelle de la masse grasse (lipides) (Tableau 3). Ces perturbations continuent jusqu'à l'âge de 70 ans, après quoi l'indice de masse corporelle (IMC) diminue significativement (Buffa *et al.*, 2011).

Tableau 3 : Modification de la composition corporelle au cours du vieillissement chez l'homme (d'après Forbes & Reina, 1970)

	Âge (an)	n	Poids corporel (kg)	Masse maigre (kg)	Masse grasse (kg)	Masse grasse (%)
Homme	25	585	73	59	14	19
	45	881	76	56	20	26
	55	835	74	52	22	30
	65-70	234	73	47	26	35
Femme	25	267	59	40	19	33
	45	391	67	39	28	42
	55	373	70	39	31	44
	65-70	144	69	35	34	49

i. Effets du vieillissement sur le métabolisme protéique

Le vieillissement est un processus qui induit aussi de nombreuses altérations métaboliques. Les altérations de la composition corporelle touchent particulièrement la masse maigre. En effet, le vieillissement est associé à des modifications importantes de la composition corporelle comme l'augmentation de la masse grasse et la diminution de la masse maigre, les os et l'eau corporelle, mais principalement les muscles dont la masse diminue chez les personnes âgées (Guo *et al.*, 1999 ; Buffa *et al.*, 2011). Ainsi, la musculature représente en moyenne 30 % du poids du corps entre 20 et 30 ans, alors qu'elle ne constitue plus que 17 % à 70 ans. Ce phénomène qui s'associe rarement à une perte de poids puisqu'il coïncide à un gain de masse grasse (Hughes *et al.*, 2002), est appelé sarcopénie liée à l'âge. La sarcopénie est définie comme une perte irréversible de la masse, de la qualité et de la force des muscles squelettiques avec l'âge (Hairi *et al.*, 2010). Les conséquences de cette fonte musculaire sont multiples : faiblesse, fatigabilité, risque accru de chutes et de fractures, perte d'autonomie et handicap.

En fait, le maintien de la masse protéique corporelle est sous l'influence de deux mécanismes, la synthèse et la dégradation. Ces deux composantes du métabolisme protéique sont sous la dépendance de nombreux facteurs comme l'apport nutritionnel, notamment en protéines, les effets hormonaux (insuline, testostérone, *etc.*) ou encore l'exercice. La sarcopénie résulte donc d'un déséquilibre entre la protéolyse et la protéosynthèse musculaire (Yarasheski, 2003). L'atrophie musculaire observée chez l'homme pourrait aussi résulter d'une perte sélective et progressive à la fois du nombre et de la taille des

fibres musculaires (Fulle *et al.*, 2004). D'autres altérations, en particulier l'oxydation et la glycation, touchent les protéines de plusieurs organes et tissus tels le cerveau, le foie, le cristallin et les fibroblastes, comme il l'a été détaillé dans les paragraphes précédents.

i. Effets du vieillissement sur le métabolisme lipidique

Nous avons mentionné ci-dessus que le vieillissement est généralement associé à une augmentation significative de la masse grasse dont la proportion entre 25 et 70 ans évolue de 19 à 35 % chez l'homme et de 33 à 49 % chez la femme (Forbes & Reina, 1970). Une accumulation sélective de tissu adipeux au niveau abdominal et plus spécifiquement intra-abdominal (viscéral) a été observée (Beaufrère & Morio, 2000). Au niveau plasmatique, la cholestérolémie et la triglycéridémie augmentent pendant les deux premiers tiers de la vie chez l'homme et les quatre cinquièmes pour les femmes, atteignant un plateau plus ou moins durable pour finalement diminuer après 70 ans. Ce changement s'accompagne d'une augmentation progressive des niveaux du cholestérol associé aux LDL (lipoprotéine de basse densité), plus rapide chez l'homme jusqu'à un plateau entre 50 et 60 ans. Ce plateau en revanche apparaît entre 60 et 70 ans chez les femmes, avant une baisse après 70 ans. En ce qui concerne les lipoprotéines de haute densité (cholestérol-HDL), ils diminuent chez les hommes entre 20/29 et 40/49 ans, avant de se stabiliser jusqu'à l'âge de 80 ans. Par contre, chez les femmes, cette diminution se prolonge tout au long de leur vie (Kuzuya *et al.*, 2002).

Le métabolisme des acides gras (AG) est aussi clairement perturbé avec l'âge. Une étude récente montre une diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation des AG, ainsi qu'une perturbation des métabolites issue de cette voie chez les souris âgées (Houtkooper *et al.*, 2011). Ceci s'accompagne d'une augmentation de la concentration plasmatique des AG libres qui pourrait résulter de perturbations dans le transport et les systèmes de captation cellulaire des AG, y compris l'oxydation et le stockage (Puga *et al.*, 2011). Signalons enfin qu'avec l'âge, la voie de biosynthèse des AGPI est fortement perturbée (Bolton-Smith *et al.*, 1997 ; Babin *et al.*, 1999 ; Houtkooper *et al.*, 2011).

ii. Effets du vieillissement sur le métabolisme glucidique

De nombreuses études rapportent l'altération du métabolisme des glucides et la réduction de la tolérance au glucose avec l'avancée en âge (Harris *et al.*, 1998). En effet, la glycémie chez l'homme s'élève progressivement avec l'âge, en moyenne par décennie de 1-2 mg/dl à jeûn et de 6 à 9 mg/dl après hyperglycémie provoquée par voie orale (Chang & Halter, 2003). L'hyperglycémie est fortement liée à la diminution de la sécrétion de l'insuline et à l'augmentation de la résistance à cette hormone. Cependant, d'autres facteurs pourraient être incriminés pour expliquer la glycémie élevée liée à l'âge, comme les habitudes alimentaires, les activités physiques, la diminution de la masse maigre, synonyme d'activité musculaire réduite, et l'augmentation de l'adiposité intra-abdominale (Scheen, 2003).

Plusieurs dysfonctionnements ont été mis en évidence chez les sujets âgés en ce qui concerne les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas endocrine et la sécrétion d'insuline : altération de la sécrétion pulsatile d'insuline, diminution de la sensibilité des cellules β vis-à-vis des hormones digestives de type incrétine (hormones gastro-intestinales qui stimulent la sécrétion d'insuline pendant l'hyperglycémie), sécrétion réduite d'amyline (peptide sécrété en même temps que l'insuline par les cellules β et qui inhibe la sécrétion du glucagon, retarde la vidange gastrique et réduit la sensation de faim), et augmentation des dépôts amyloïdes (Chang & Halter, 2003 ; DeFronzo, 2004 ; Scheen, 2005). Le vieillissement est également associé à une résistance à l'insuline, signifiant une baisse de la sensibilité à l'insuline qui peut se traduire par une captation du glucose diminuée de 30% chez les personnes âgées (Finch & Cohen, 1997). Ce mécanisme est directement lié au diabète de type 2.

b. Sur le système nerveux central

De nombreuses modifications structurelles et neurophysiologiques du SNC ont été décrites au cours du vieillissement. Ces modifications sont accompagnées d'un niveau variable de gravité du déclin cognitif (Bishop *et al.*, 2010). Ainsi, il a été démontré une nette diminution avec l'âge du volume total du cerveau, des lobes frontal et temporal surtout, et dans une moindre mesure des lobes pariétal et occipital (DeCarli *et al.*, 2005). D'autres études ont rapporté que certaines aires cérébrales sont plus sensibles au vieillissement que d'autres. Ainsi, un rétrécissement sensible du noyau caudé, du cervelet, de l'hippocampe et des cortex associatifs a été révélé au cours du vieillissement chez l'homme, accompagné d'un léger rétrécissement du cortex entorhinal. Pour le cervelet, deux phases successives ont été distinguées (Raz *et al.*, 2005) : la première jusqu'à l'âge adulte moyen, lors de laquelle le rétrécissement diminue, et la deuxième jusqu'à la vieillesse lors de laquelle il augmente. La situation diffère pour l'hippocampe, le cortex entorhinal, le cortex temporal inférieur et la substance blanche préfrontale qui semble évoluer de façon monotonique. Une hypothèse a été récemment développée, nommée « *last in, first out* », proposant que les aires cérébrales caractérisées par une maturation tardive soient les plus vulnérables au vieillissement. Ainsi, McGinnis *et al.* (2011) ont rapporté que les cortex primaires sensoriels / moteurs et paralimbiques atteignent les niveaux d'épaisseur correspondant à leur stade mature avant les cortex associatifs unimodal et hétéromodal. Ils ont également observé que le vieillissement semble associé en priorité à un amincissement du cortex associatif hétéromodal, tandis que les cortex primaires sensoriels/ moteurs ne sont affectés que dans les stades de vieillissement les plus avancés (Figure 11). Il est intéressant de mentionner que l'amincissement de certaines zones cérébrales est accompagné d'un élargissement des sillons et d'une augmentation du volume des ventricules (DeCarli *et al.*, 2005 ; Fjell *et al.*, 2009).

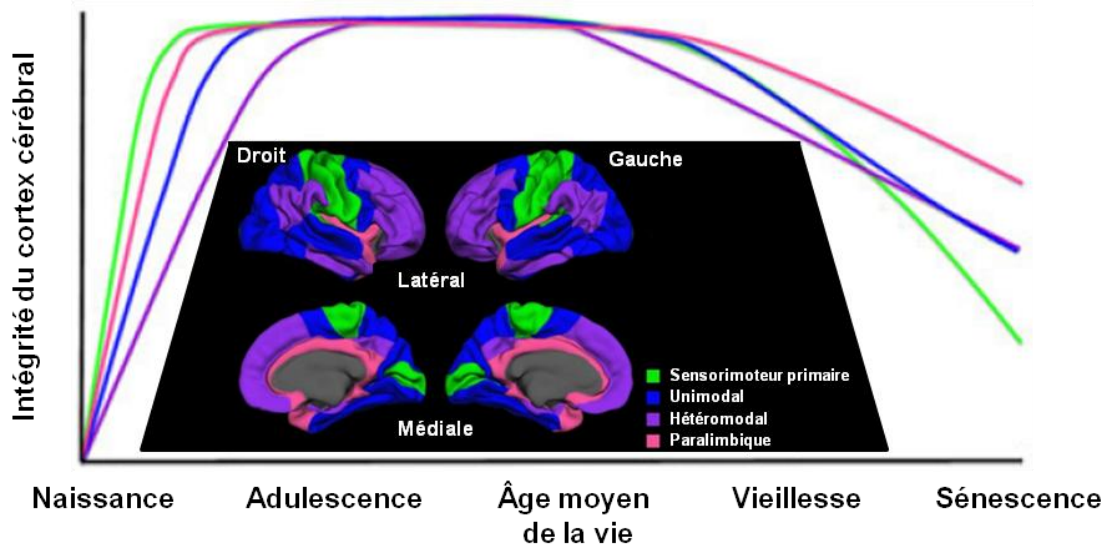


Figure 11 : Hypothèse « last in, first out » du vieillissement du cortex (d'après McGinnis *et al.*, 2011)

À l'échelle microscopique, différentes altérations ont été rapportées au cours de vieillissement. En effet, les études *post mortem* chez l'homme et chez les animaux suggèrent que le déclin cognitif lié à l'âge semble plus vraisemblablement associé à des altérations de la connectivité synaptique qu'à la perte neuronale (Peters *et al.*, 1998 ; Burke & Barnes, 2006). Parmi ces altérations :

- Une sous-expression des gènes associés à la transmission et à la plasticité synaptique dans l'hippocampe et une diminution des synapses perforées impliquées dans la plasticité liée à la mémoire (Burke & Barnes, 2006 ; Morrison & Baxter, 2012). Généralement de morphologie semblable à un champignon et de taille relativement grande, elles montrent une discontinuité de la densité post-synaptique et elles expriment des zones de récepteurs très étendues, ce qui pourrait induire l'expression au niveau de ces synapses de nouveaux récepteurs NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate) et AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisol-4-propionate).
- Une diminution des épines dendritiques minces « *thin spine* », particulièrement les plus petites, essentielles pour la plasticité synaptique, la procédure d'apprentissage et la mémoire à court terme, et une forte diminution des synapses axo-épineuses et des synapses silencieuses du cortex préfrontal (Figure 12) (Dumitriu *et al.*, 2010 ; Morrison & Baxter, 2012).

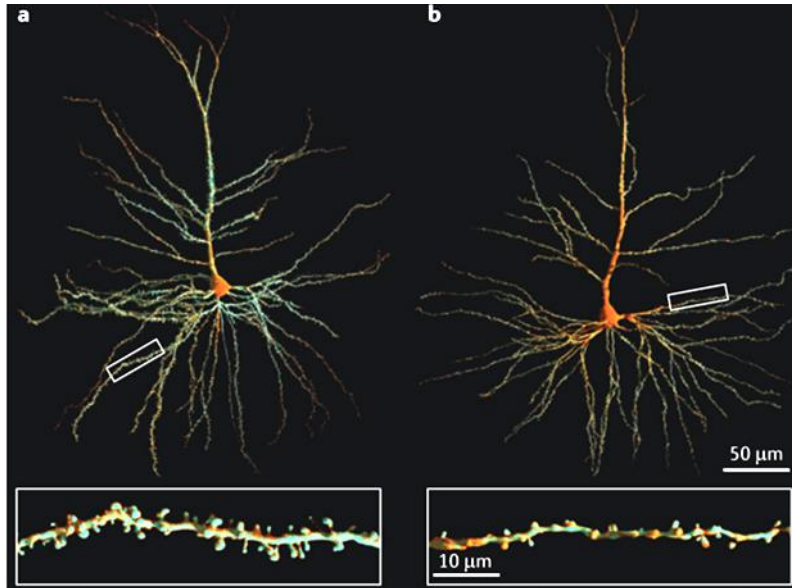


Figure 12 : Épines dendritiques des neurones corticaux de primates non humains jeunes et âgés (d'après Morrison & Baxter, 2012)

Image au microscope confocal à balayage laser (MCBL) des neurones du cortex préfrontal chez les primates non humains jeunes (a) ou âgés (b), marqués par injection d'un colorant fluorescent (jaune Lucifer). Ce marquage ne montre pas de différence notable de l'arborisation dendritique globale avec l'âge ; mais un plus fort grossissement d'un segment dendritique basal (rectangle en dessous de chaque neurone) permet d'observer une diminution significative de la densité des épines dendritiques, particulièrement des épines dendritiques minces.

- Une augmentation de la conductance du Ca^{2+} dans l'hippocampe, donc une augmentation de l'hyperpolarisation post-potentielle, induisant le fait que les neurones déclenchent moins de potentiels d'action (Burke & Barnes, 2006).
- Une diminution radicale de la neurogenèse dans le gyrus denté (Kuhn *et al.*, 1996; Bizon & Gallagher, 2003).
- Une diminution de la densité et de la plasticité des microvaisseaux cérébraux, ce qui perturbe la diffusion des substrats énergétiques comme l'oxygène et le glucose, indispensables pour le fonctionnement du cerveau qui est, rappelons-le, le plus gros consommateur d'énergie (Riddle *et al.*, 2003).
- Une diminution dramatique de la substance blanche, liée à une perte tous les 10 ans entre 20 et 80 ans d'environ 10% de la longueur totale moyenne des fibres myélinisées chez l'homme (Marnier *et al.*, 2003). D'autres modifications sont plus discrètes, notamment la rupture des gaines de myéline et des éléments cytosquelettiques des axones, la perte liée à l'âge des fibres nerveuses cholinergiques et le raccourcissement des fibres myélinisées (Ypsilanti *et al.*, 2008 ; Peters, 2009).

Le vieillissement s'accompagne aussi d'une altération globale de la composition lipidique membranaire dans le cerveau. Une perte du taux de cholestérol lié à l'âge a été signalée dans la membrane neuronale chez les rongeurs ainsi que chez l'homme. Cette perte est liée à une diminution de la synthèse du cholestérol, ainsi qu'à une augmentation de son catabolisme. Par contre, les teneurs en sphingolipides comme les céramides,

les sphingomyélines et les gangliosides sont augmentés dans différentes régions cérébrales. Quant aux acides gras polyinsaturés (AGPI), leurs teneurs semblent diminuer au cours du vieillissement dans le cortex, l'hippocampe, le striatum et l'hypothalamus (Ledema *et al.*, 2012).

c. Sur le système cardiovasculaire

L'âge modifie très spécifiquement les gros vaisseaux comme l'aorte et les coronaires. De ce fait, la réserve coronaire est réduite et le cœur sénescence est davantage sensible à l'ischémie que le cœur du sujet plus jeune. En 2002, l'étude FINE a suivi 2.170 hommes âgés de 65 à 84 ans en Finlande, Italie et Pays-Bas pendant 10 ans. Le cholestérol total, le cholestérol-HDL, le tabac, l'hypertension artérielle et l'hypertrophie ventriculaire gauche ont été identifiés comme les facteurs de risque de mortalité coronarienne et cardiovasculaire les plus importants dans la population suivie (Houterman *et al.*, 2002).

i. Effets du vieillissement sur le cœur

Avec l'âge, des changements s'opèrent au niveau fonctionnel, morphologique et cellulaire. D'un point de vue fonctionnel, au repos, il n'y a de changement ni du débit cardiaque, ni du volume d'éjection diastolique ou systolique final. Cependant, la rigidité du myocarde augmente avec l'âge, avec une baisse significative du nombre de cellules du nœud sino-auriculaire responsables du rythme cardiaque. Au niveau morphologique et cellulaire, le nombre de myocytes diminue, associé à une hypertrophie des cellules vivantes. Cette perte cellulaire s'accompagne d'une fibrose, le principal déterminant des anomalies du remplissage ventriculaire et des arythmies, ainsi que d'une diminution de l'activité des collagénases et donc une augmentation du collagène. De plus, les myocytes vieillissants montrent une contraction et une relaxation prolongées à cause de modifications de l'homéostasie du Ca^{2+} . Enfin, les mitochondries ont tendance à augmenter de volume, mais deviennent moins efficaces et produisent par conséquent moins d'ATP (Wong *et al.*, 2010).

ii. Effets du vieillissement sur les vaisseaux

La paroi artérielle est classiquement décrite comme la succession de trois couches : l'adventice, la média et l'intima, au sein desquelles existent de nombreuses interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire. Grossièrement, on retrouve principalement des cellules endothéliales au niveau de l'intima, des cellules musculaires lisses dans la média et des péricytes et des fibroblastes dans l'adventice (Seeley *et al.*, 2003). Au cours du vieillissement chez l'homme, l'aspect morphologique des artères, surtout élastiques, change : (i) le diamètre (de 6,9 cm entre 19 et 44 ans à 8,5 cm après 65 ans pour la crosse aortique) et la longueur augmentent ; (ii) l'intima et la média des parois s'épaississent ; (iii) les artères deviennent plus rigides et leur contenu en élastine diminue (Lee & Oh, 2010). En revanche, les résistances périphériques et la pression artérielle semblent inchangées avec l'âge.

Le vieillissement artériel se traduit par l'artériosclérose et l'athérosclérose, deux processus d'évolution structurale et fonctionnelle de l'arbre vasculaire interdépendants et très intimement liés et caractérisés par certains événements cellulaires et moléculaires communs. L'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et de moyen calibre consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires. Ce remodelage de l'intima s'accompagne de modifications de la média (Ross, 1993). La description actuelle de l'athérosclérose retient les stades suivants : (i) rétention de lipoprotéines athérogènes dans l'intima ; (ii) modification physicochimique des lipoprotéines retenues sous l'influence d'un stress oxydant local exacerbé ; (iii) recrutement des monocytes circulants ; (iv) formation de la chape fibromusculaire ; (v) calcification de la plaque. L'artériosclérose liée au vieillissement se caractérise, elle, par une rigidification et un épaississement de la paroi artérielle qui peut avoir un retentissement au niveau cardiaque (Stary *et al.*, 1995). L'artériosclérose est définie comme l'épaississement et la perte d'élasticité de la paroi des artères de toutes tailles liés à des modifications structurales de l'intima et de la média. Il en résulte une diminution de la capacité des artères élastiques à se modifier, une altération de la fonction endothéliale, ainsi qu'une augmentation du diamètre des artères de gros et moyen calibres (O'Rourke, 2007). Ces artères jouent un rôle important dans l'amortissement de la pression sanguine à la sortie du ventricule et participent à l'efficacité du système cardiovasculaire (McEniery *et al.*, 2007).

Enfin, une forte corrélation a été rapportée entre le taux élevé de cholestérol sanguin et le risque des maladies des vaisseaux coronaires au cours de vieillissement (Gobal & Mehta, 2010).

5. Vers un vieillissement réussi

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le vieillissement réussi représente une situation dans laquelle l'individu vieillit sans pathologie ni handicap, avec un niveau de fonction supérieur à celui du vieillissement normal, accompagné de capacités cognitives et fonctionnelles élevées, ainsi qu'un engagement et des activités dans la vie quotidienne. Il s'intègre dans un contexte plus large de qualité de vie, considérant que l'individu conserve une bonne santé, mais aussi sa satisfaction par rapport à son rôle social et à l'égard des liens affectifs entretenus avec son entourage familial et relationnel. L'alimentation optimale équilibrée est ressortie comme l'un des trois principaux déterminants du vieillissement réussi, avec la pratique d'activités physiques et l'activité intellectuelle. Une alimentation équilibrée se caractérise par une alimentation conforme, en quantité comme en qualité, aux besoins liés à la dépense énergétique. Ainsi, la consommation de lipides ne nécessite pas impérativement d'être réduite, mais plutôt modérée, diversifiée et choisie, en évitant le plus possible les AG saturés. Par contre, la consommation d'AGPI, et notamment ceux de la série *n*-3, est fortement conseillée. Incorporés dans les phospholipides membranaires, les AGPI, sont des constituants structuraux fondamentaux, en particulier dans le SNC, mais jouent aussi le rôle de modulateurs de l'expression des

gènes et de seconds messagers qui peuvent participer au contrôle de la survie cellulaire (Florent-Bécharde *et al.*, 2007 ; Dyllal & Michael-Titus, 2008). Du fait d'une diminution de la synthèse des AGPI avec l'âge (Bolton-Smith *et al.*, 1997 ; Babin *et al.*, 1999), leurs teneurs reposent davantage sur leur apport nutritionnel et ils sont donc considérés comme des AG essentiels pour le sujet âgé. Le cholestérol aussi est indispensable en participant à l'organisation et à l'architecture des membranes cellulaires, en particulier celles de SNC. Il est également un précurseur de nombreuses hormones essentielles et de la vitamine D.

Nous avons cité précédemment l'existence d'un déséquilibre entre la protéolyse et la protéosynthèse au cours du vieillissement. Il faut donc assurer un apport alimentaire de protéines et les recherches sont aujourd'hui orientées également sur la production d'aliments riches en protéines qui puissent être consommés facilement par la personne âgée en dépit des difficultés qu'elle peut présenter. L'objectif est clair : éviter la sarcopénie, maintenir une masse musculaire satisfaisante qui puisse garantir la possibilité de mener aisément des activités physiques sans fatigue excessive.

L'équilibre nutritionnel repose donc sur la bonne représentation des glucides, des lipides et des protéines, mais il faut compter aussi sur les micronutriments tels que les minéraux et les vitamines, indispensables au quotidien pour assurer le bon fonctionnement de l'organisme et dont la carence est corrélée à une fréquence accrue des pathologies liées au vieillissement. Comme nous l'avons indiqué précédemment, la production radicalaire augmente avec l'âge, coïncidant avec la baisse des défenses antioxydantes, ce qui souligne davantage encore la nécessité d'inclure dans le régime des aliments riches en antioxydants exogènes comme les vitamines et les polyphénols (Hausman *et al.*, 2011) ainsi qu'en minéraux comme le calcium, le phosphore ou le magnésium (Elmadfa & Meyer, 2008). Évidemment, aucun aliment unique ne contient tous ces nutriments et c'est pourquoi le Programme National Nutrition Santé recommande de consommer des aliments différents, appartenant à chacun des groupes d'aliments, en quantité suffisante et variable, afin de couvrir les besoins nutritionnels.

Le deuxième déterminant est la pratique d'activités physiques (AP). L'existence d'un effet positif d'une pratique régulière sur la santé cérébrale et cognitive des seniors n'est aujourd'hui plus discutée. L'exercice d'une AP régulière contribue à améliorer les performances cognitives, à contrôler fortement l'augmentation de la masse grasse, la prise du poids, à limiter les désordres métaboliques et donc à réduire sensiblement le risque d'incident cardiovasculaire. De plus, l'AP contribue à prévenir la sarcopénie en préservant la masse musculaire et les performances générales des muscles squelettiques.

La stimulation intellectuelle est le troisième élément déterminant pour un vieillissement réussi, visant donc à favoriser l'activité cérébrale. Les individus qui pratiquent une activité de stimulation intellectuelle (lecture, nombreux jeux intellectuels « dames, échec, mots croisés, *etc* », tutorat, passer à de nouveaux apprentissages : apprendre à jouer d'un instrument de musique, travailler à temps partiel dans des activités totalement nouvelles et que l'on ne maîtrise pas, apprendre de nouvelles danses, de la jonglerie, du cyclisme) présentent moins de risque de développer une démence. En effet, la stimulation intellectuelle permet de consolider les apprentissages et protège contre le déclin cognitif.

Pour conclure sur cette première partie, rappelons quelques données éloquentes avancées par l'INSEE. En France, alors que l'espérance de vie globale s'allonge régulièrement d'environ un trimestre par an, l'espérance de vie sans incapacité stagne désespérément depuis plusieurs années autour de 62 ans. Dans ces conditions, les seniors doivent s'apprêter à passer les 15 à 20 dernières années de leur vie sous traitement médical susceptible d'affecter plus ou moins lourdement et durablement leur mode de vie. Ces chiffres traduisent certainement les choix effectués en matière de recherche et de santé publique depuis plusieurs décennies, privilégiant le seul recours thérapeutique au détriment de la médecine préventive, avec les conséquences que l'on sait sur le coût de la santé et le déficit budgétaire chronique des caisses de sécurité sociale et d'assurance maladie. La prévention contre le vieillissement pathologique passe par l'amélioration du mode de vie : une nutrition optimale équilibrée, une activité physique modérée et prolongée, une activité intellectuelle stimulée, un engagement professionnel ou social préservant la reconnaissance et prévenant de l'isolement. Une politique de promotion de l'ensemble de ces déterminants du mode de vie permettrait de favoriser l'évolution avec l'âge vers un vieillissement réussi plutôt que pathologique. La diminution de l'incidence des pathologies liées au vieillissement comme l'obésité et le diabète, ainsi que les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, représente l'un des leviers essentiels par lesquels l'autonomie des personnes âgées pourrait être prolongée, améliorant de fait leur qualité de vie tout en réduisant l'impact socioéconomique de l'allongement de l'espérance de vie. Il s'agit là d'un défi sociétal de premier ordre pour faire face aux changements démographiques qui s'imposent aujourd'hui à nos sociétés occidentales.

B. La maladie d'Alzheimer

1. La maladie d'Alzheimer : un siècle déjà

La maladie d'Alzheimer (MA) est décrite pour la première fois par le neurologue Aloïs Alzheimer (1864-1915) en 1906 à propos d'une patiente de 51 ans appelée Auguste Deter. Les symptômes cliniques de cette patiente se sont manifestés tout d'abord par une jalousie excessive et un déclin cognitif associé à des troubles mnésiques, puis une désorientation temporelle et spatiale, une perte de la mémoire à court terme et de la capacité de lecture. Malgré un déménagement, Alzheimer a suivi sa patiente jusqu'à son décès, puis il a réalisé l'étude histopathologique de son cerveau qui a révélé des lésions jusqu'alors inconnues, caractérisées par des amas anormaux de fibrilles dans les neurones, les dégénérescences neurofibrillaires. Il a également décrit des altérations situées en dehors des neurones, nommées les plaques séniles (Alzheimer *et al.*, 1995). En 1910, la communauté médicale de l'époque donne à cette forme de démence le nom de celui qui l'avait mis en évidence, la maladie d'Alzheimer.

Les connaissances sur cette maladie n'ont évolué que vers la fin du XXe siècle. Une compréhension plus étendue de la maladie a conduit à une amélioration de sa définition. La MA est une démence neurodégénérative, caractérisée par la perte progressive et irréversible des neurones dans des régions spécifiques du cerveau. Elle se définit comme une démence évolutive et qui mène inévitablement à la mort après avoir altéré les fonctions cognitives en affectant graduellement la mémoire, les capacités d'apprentissage et le langage, provoqué des changements comportementaux et de personnalité, et interféré avec la capacité individuelle à réaliser les activités quotidiennes. Cette démence a été associée à deux types de lésions caractéristiques, les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires (Selkoe, 2001), bien qu'Alzheimer lui-même ait constaté que tous les patients souffrant de cette maladie ne présentaient unanimement les mêmes anomalies.

2. Prévalence, incidence et impact socio-économique

La MA touche environ 860.000 personnes en France et l'on estime à plus de 225.000 le nombre de nouveaux cas chaque année (Gallez, 2005). Ce chiffre devrait passer à 1,2 millions en 2020 et 2,1 millions en 2040 si l'incidence et la durée de la maladie ne changent pas d'ici là. La prévalence augmente très fortement avec l'âge: d'environ 1% à l'âge de 60 ans, elle double tous les cinq ans pour atteindre 40% à l'âge de 85 ans et plus. Cette maladie est la forme la plus commune de démence sénile (70% des démences). Au niveau mondial, *Alzheimer's Disease International* estimait qu'en 2010, il pourrait y avoir 35,6 millions de personnes souffrant de démence, et que ce chiffre passerait à 65,7 millions en 2030 et 115,4 millions en 2050 (World Alzheimer Report 2010).

Selon l'étude PAQUID (Personnes Agées QUID), la MA touche plus de femmes que d'hommes puisqu'au delà de 75 ans, les proportions sont de 13,2% pour les hommes et de 20,5% pour les femmes. La diminution post-ménopausique des œstrogènes endogènes pourrait être liée à ce risque. Les œstrogènes exerceraient des effets neuroprotecteurs sur le cerveau âgé, dont l'inhibition de la formation de peptide bêta-amyloïde (Gallez, 2005).

Le vieillissement de la population dans les pays industrialisés fait de la MA un problème économique sérieux, puisqu'il faudra financer un volume croissant de soins à long terme aux personnes âgées atteintes de cette pathologie. Le rapport d'Office Parlementaire d'Évaluation des Politiques de Santé (OPEPS) estimait, en 2005, le coût annuel moyen par patient à 22.099 €, soit une charge annuelle de 18,8 milliards d'euros. Les coûts directs représenteraient un montant total de 9,9 milliards d'euros (Gallez, 2005), dont 9,4% de dépenses médicales contre 90,6% pour le coût médico-social. Cette maladie est devenue un problème majeur de santé publique et un véritable fléau social. Toute la société est sollicitée, la construction des structures d'accueil adaptées devient indispensable mais reste largement inférieure aux besoins, et plus que jamais la communauté scientifique est mobilisée.

3. Stades cliniques

Le processus physiopathologique de la MA commence bien avant le stade démentiel, par l'apparition de troubles cognitifs diversement associés et parfois de troubles du comportement ou de la personnalité. L'évolution s'étale sur plusieurs années lors desquelles apparaît une dépendance progressive qui retentit sur les activités de la vie quotidienne. Cette longue phase « préclinique » de MA offrirait une occasion cruciale pour l'intervention thérapeutique (Sperling *et al.*, 2011), encore faudrait-il prendre effectivement conscience alors du processus qui est enclenché. En effet, il existe une grande variabilité interindividuelle dans la progression des troubles liés à cette maladie. Certaines personnes parviendront à un stade clinique plus rapidement que d'autres, certainement en raison de l'influence complexe d'une grande variété de facteurs capables de ralentir le déclin, incluant notamment les paramètres qui déterminent l'évolution vers un vieillissement réussi (*e.g.* réserve cognitive, niveau d'études, activités stimulantes, régime alimentaire, activités physiques, *etc.*). Il est néanmoins possible de proposer un profil général de l'évolution de la MA que l'on peut découper en cinq stades en fonction des scores obtenus par le test MMSE ou *Mini Mental State Examination* (Feldman & Woodward, 2005).

Le stade préclinique ou présymptomatique (MMSE \geq 29/30) peut s'étendre sur plusieurs années, voire décennies, au cours desquelles les biomarqueurs traduisent l'installation progressive d'un processus pathologique et les lésions cérébrales apparaissent silencieusement, alors que les sujets restent sans symptôme clinique et sans plainte mnésique particulière (Figure 13). Cette phase précoce est d'autant plus importante qu'elle représenterait la fenêtre de temps la plus favorable pour traiter la maladie et interrompre, voire réverser le processus enclenché (Jack *et al.*, 2010). Pouvoir identifier et dépister les individus le plus tôt possible et dès cette phase afin d'influer sur leur devenir représente donc un challenge et un enjeu évident en termes de prévention de la MA.

Le stade MCI (*mild cognitive impairment* ou déficit cognitif léger, score MMSE \geq 26) est considéré comme un état intermédiaire entre les changements cognitifs normaux liés au vieillissement et les premiers signes cliniques de la démence. Les symptômes plus ou moins décelables émergent, comme des plaintes mnésiques liées à un déficit avéré, une humeur changeante et un manque d'intérêt et d'initiative. Toutefois, les patients MCI ne présentent aucune démence, mais un fonctionnement cognitif globalement normal qui leur permet de réaliser seuls les actes de la vie quotidienne (Figure 14).

Le stade MA légère (score MMSE $>$ 26), première phase de la MA, peut durer de 2 à 4 ans. Lorsque les lésions cérébrales ont atteint le seuil symptomatique, les manifestations cliniques de la démence apparaissent, traduisant l'insuffisance des mécanismes compensatoires. Ainsi, les troubles de la mémoire à court terme et de la mémoire épisodique deviennent plus marqués. Le malade exprime des difficultés à retenir de nouvelles informations, suivre des conversations et faire de nouveaux apprentissages. Les troubles de l'attention, de la concentration et de l'orientation s'aggravent, ainsi que l'aphasie amnésique. Des altérations comportementales, dont l'anxiété, le stress, la dépression ou la perte d'intérêt, apparaissent en raison notamment de la prise de conscience du déclin (Figure 14).

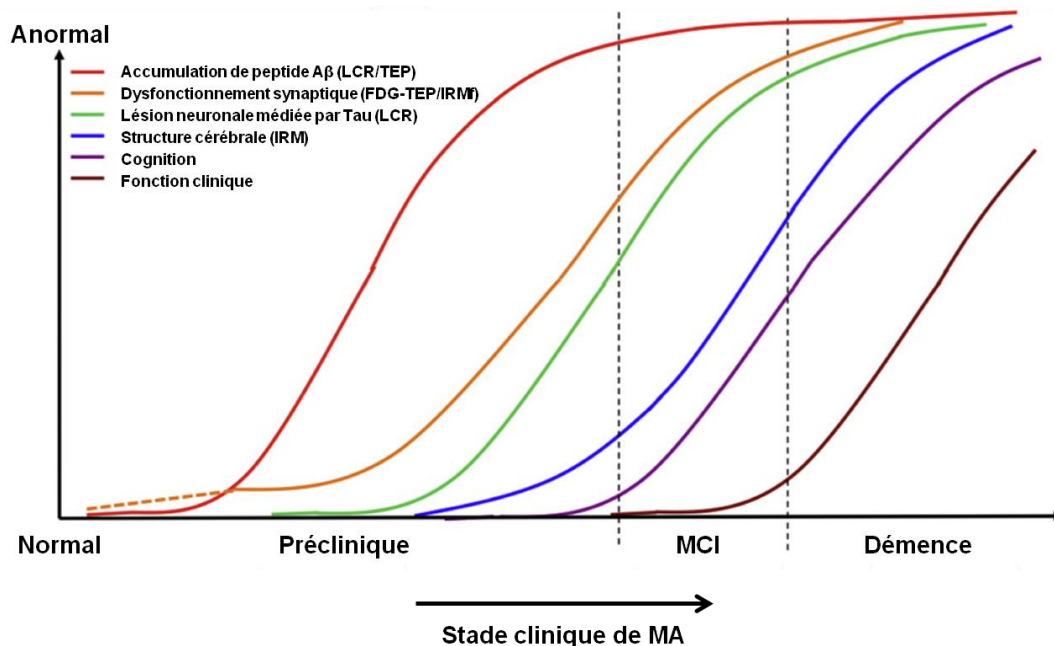


Figure 13 : Modèle d'évolution de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (d'après Sperling *et al.*, 2011)

Dans ce modèle, les biomarqueurs deviennent anormaux de façon séquentielle. Les premiers à devenir anormaux sont les biomarqueurs amyloïdes investigués par tomographie par émission de positons (TEP) ou recherche biochimique du peptide A β dans le liquide céphalorachidien (LCR). Puis ce sont les biomarqueurs du dysfonctionnement synaptique mis en évidence en TEP par marquage au fluorodésoxyglucose (¹⁸FDG-TEP) ou imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf). La ligne pointillée orange indique que le dysfonctionnement synaptique pourrait être détecté avant le peptide A β chez les porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ du gène de l'apolipoprotéine E. Les lésions neuronales et cérébrales apparaissent ensuite, identifiées par la protéine tau dans le LCR ou par IRM, avant que ne se révèlent les premiers symptômes cognitifs et cliniques.

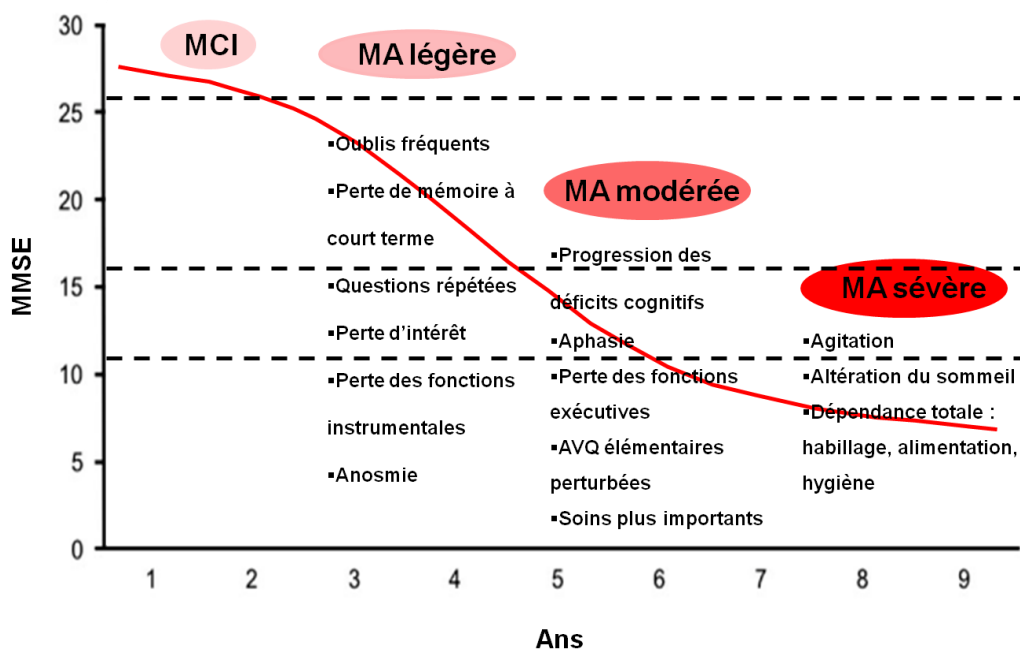


Figure 14 : Progression des symptômes de la maladie d'Alzheimer (d'après Feldman & Woodward, 2005)
AVQ : Activités de la vie quotidienne

Le stade MA modérée (score MMSE entre 10 et 20) dure de 2 à 6 ans, lors desquels les symptômes du stade de MA légère se renforcent : les pertes mnésiques s'accroissent, la mémoire des faits récents est très altérée, celle des faits anciens commence à l'être aussi. Les troubles de l'orientation temporelle et spatiale s'aggravent et les changements de la personnalité et du comportement sont plus marqués. L'autonomie du malade est déjà compromise à ce stade (Figure 14).

Le stade MA sévère (score MMSE ≤ 10) peut durer de 2 à 4 ans, lors desquels l'état du malade est fortement détérioré en raison de l'aggravation de tous les symptômes décrits précédemment. La mémoire des faits anciens est profondément altérée. La personne ne reconnaît plus ses proches ni les soignants et elle ne répond plus aux stimulations extérieures. La communication est pratiquement impossible et la dépendance est totale (Figure 14).

4. Éléments de diagnostic

Il n'existe actuellement aucun marqueur satisfaisant permettant de diagnostiquer la MA de façon précoce, puisque seule l'étude anatomopathologique du cerveau permet le diagnostic de « certitude ». À l'heure actuelle, la MA est diagnostiquée par la convergence des résultats de différents examens sur la base de la symptomatologie clinique, de tests neuropsychologiques, de dosages de marqueurs biochimiques et le recours à des techniques d'imagerie.

a. *Caractérisation post mortem des lésions microscopiques*

Comme Alzheimer l'avait lui-même montré, la MA peut être diagnostiquée *post mortem* en mettant en évidence par des examens histopathologiques la présence de deux types de lésions, les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires (Figure 15a, c et e) et les plaques amyloïdes extracellulaires (Figure 15b, d et e), même s'il avait aussi observé l'absence de l'un ou de ces deux marqueurs chez certains malades. Quoi qu'il en soit, ils ne peuvent qu'être considérés comme des marqueurs de stades très avancés ou ultimes et en l'absence d'un autre moyen de diagnostic réellement discriminant, les cliniciens considèrent encore aujourd'hui l'autopsie comme nécessaire pour établir le diagnostic de certitude de la MA...

i. Les neurodégénérescences neurofibrillaires

Les neurodégénérescences neurofibrillaires (DNF) sont des dépôts filamenteux anormaux présents dans le cytoplasme de neurones en dégénérescence. Ces lésions sont constituées de paires de filaments hélicoïdaux (PHF, *paired helical filaments*) dont le constituant principal est la protéine Tau (*tubule-associated unit*), protéine appartenant à la famille des MAP (*microtubule-associated proteins*). D'abord intracellulaires, les DNF persistent comme des « fantômes » à l'extérieur après la mort et la disparition des cellules touchées. Ces filaments sont pathologiques et constituent d'excellents marqueurs ultrastructuraux de la MA (Figure 15 a, c et e).

Il existe une hiérarchie topographique des lésions dont le champ progresse en débutant par le cortex entorhinal, puis l'hippocampe et l'isocortex (Braak & Braak, 1991). Les lésions et les signes cliniques associés permettent de distinguer 10 stades correspondant aux différentes régions cérébrales affectées successivement au cours de la MA (Buée & Delacourte, 2006) et de distinguer 3 groupes :

- le vieillissement normal (stades S0 à S3), avec une atteinte de la région hippocampique pour les individus âgés de plus de 50 ans ;
- une phase asymptomatique ou préclinique (stades S4 à S6), lors de laquelle la DNF s'installe dans quelques régions cérébrales (régions temporales) sans pour autant qu'il y ait de manifestations cliniques évidentes ;
- une phase clinique (stades S7 à S10) qui correspond à la présence de la DNF dans de nombreuses régions corticales (aires associatives polymodales, corticales primaires, visuelles et motrices).

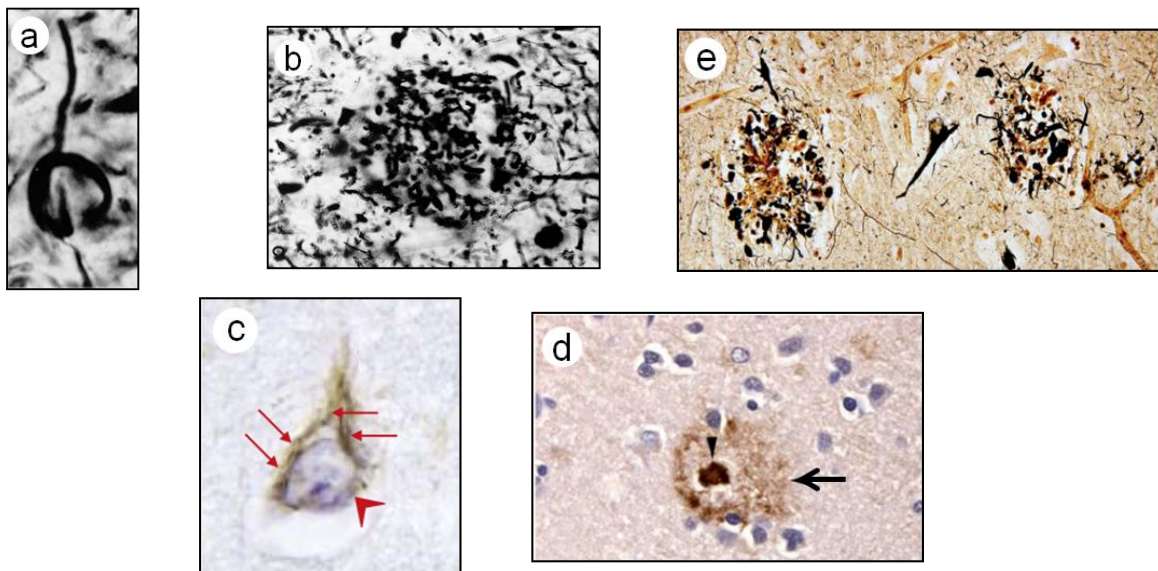


Figure 15 : Plaques amyloïdes et dégénérescences neurofibrillaires, les marqueurs histopathologiques de la MA

Les coupes transversales montrent après coloration de Bielschowsky : (a) une DNF ; (b) une plaque amyloïde du cortex cérébral d'Auguste Deter (d'après Graeber et al., 1998) ; (c) une DNF visualisée par immunomarquage de Tau, avec le noyau indiqué par une tête de flèche et des fibrilles de protéine Tau (petites flèches) dans le corps cellulaire du neurone (d'après Dhenain et al., 2002) ; (d) immunomarquage d'un dépôt dense de peptide A β (tête de flèche) occupant le centre de la plaque sénile, entouré d'une couronne claire puis d'un halo (flèche) de dépôt diffus (d'après Duyckaerts et al., 2009) ; (e) deux plaques séniles et une DNF dans le cortex temporal d'un patient atteint de MA (d'après Perl, 2010).

ii. La protéine Tau et son implication dans les neurofibrilles

La protéine Tau est principalement exprimée dans les neurones et préférentiellement localisée dans les axones. Elle joue un rôle dans l'assemblage et la stabilité des microtubules, fonctions essentielles pour le maintien de la morphologie cellulaire et la régulation du transport axonal (Drechsel *et al.*, 1992 ; Shahpasand *et al.*, 2012). Leur présence est primordiale pour la croissance neuritique, ainsi que pour le développement de la polarité et le transport axonal (Dawson *et al.*, 2001) et les cellules surexprimant

Tau sont plus résistantes aux *stimuli* apoptotiques (Wang *et al.*, 2010a). Tau a aussi de nombreux partenaires, y compris des médiateurs de signalisation cellulaire, des éléments du cytosquelette, des lipides et des enzymes (Morris *et al.*, 2011).

La protéine Tau pathologique est hyperphosphorylée par diverses kinases, telles que Cdk5 (*cyclin-dependent kinase 5*, Liu *et al.*, 2004) et GSK3 (*glycogen synthase kinase-3*, Mines *et al.*, 2011), activées notamment par l'augmentation des concentrations de Ca^{2+} intracellulaires suite à l'exposition au peptide β -amyloïde ($A\beta$). Il s'agit là de l'un des plus précoces des mécanismes de neurotoxicité activés par ce peptide et sur lesquels nous reviendrons en détail dans les chapitres suivants. Des travaux suggèrent que l'action synergique de plusieurs kinases, y compris CamKII (*calcium-calmodulin-dependent protein kinase II*) et PKA (protéine kinase A), est nécessaire pour convertir Tau en protéine pathologique (Liu *et al.*, 2006). L'hyperphosphorylation de Tau résulterait donc à la fois de l'augmentation de l'activité des kinases et de la diminution de celle des phosphatases (Liu *et al.*, 2005).

Ainsi hyperphosphorylée, la protéine Tau se dissocie des microtubules (Cowan *et al.*, 2010), ce qui affecte la stabilité et le fonctionnement de ces derniers (Figure 16). Il en résulte une altération des transports axonaux et dendritiques, ainsi qu'une dégénérescence du neurone. De plus, la protéine hyperphosphorylée libérée montre une solubilité nettement plus faible, notamment en conséquence des changements conformationnels induits par le stress oxydant auquel elle est plus sensible. Elle s'agrège donc selon un processus de polymérisation, avec une étape de nucléation sous forme de PHF (Barghorn & Mandelkow, 2002). Ces dernières s'associent ensuite en structures plus grandes, les DNF.

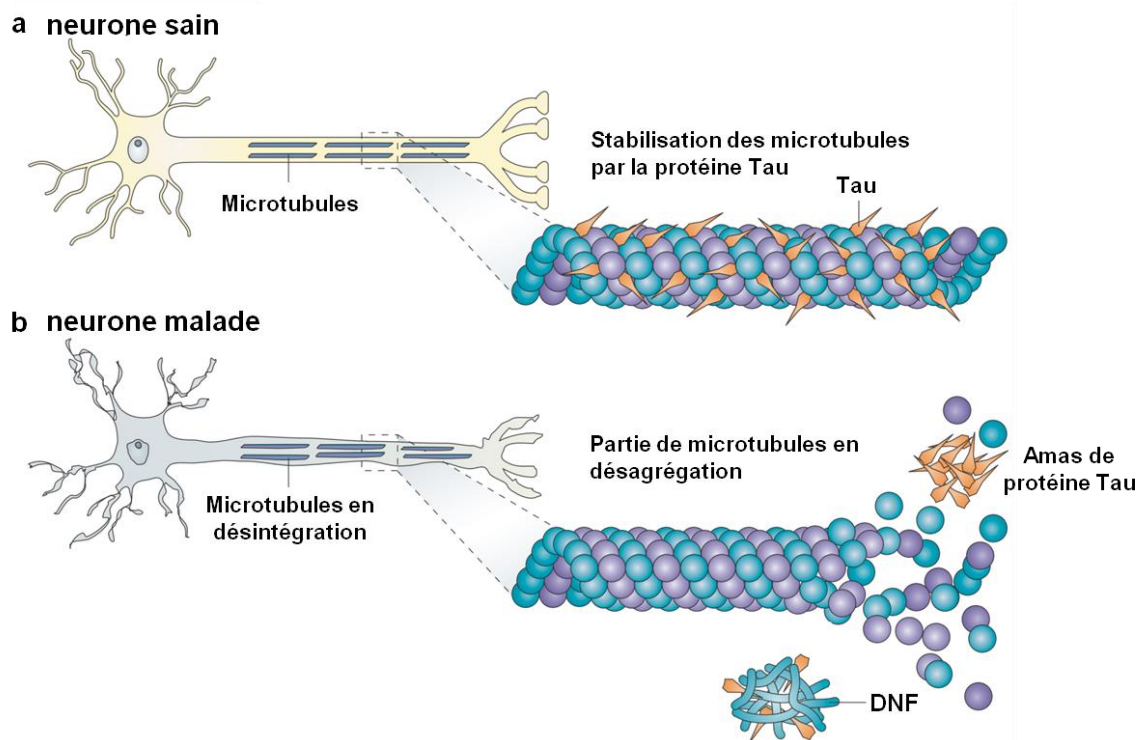


Figure 16 : Protéine tau & tauopathie (d'après Brunden *et al.*, 2009)

iii. Lésions amyloïdes

Les lésions amyloïdes ont en commun leur structure chimique, en feuillets β plissés, qui les rendent insolubles. Elles sont constituées du peptide β -amyloïde ($A\beta$), d'une masse moléculaire d'environ 4 kDa et dont la taille varie de 32 à 43 acides aminés. Le peptide $A\beta$ a tendance à s'agréger sous forme de dépôts insolubles diffus ou denses détectables par le rouge Congo ou la thioflavine-S. Les dépôts amyloïdes commencent à apparaître dans les parties basales du néocortex (stade A), puis dans tout le néocortex à l'exception du cortex primaire (stade B). L'hippocampe est légèrement touché à ce stade (Braak & Braak, 1991). Les dépôts gagnent plus tard les régions frontales et temporales, avant d'envahir enfin l'ensemble du cortex au stade C (Figure 17).

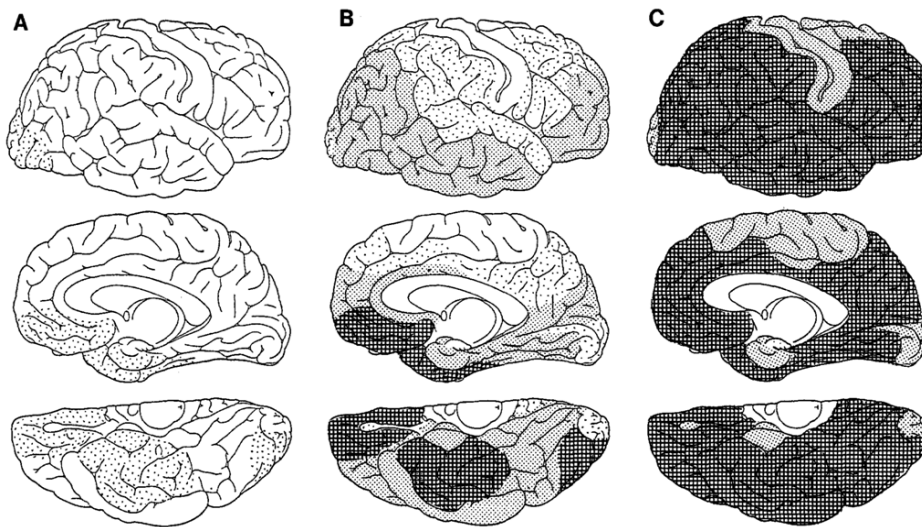


Figure 17 : Extension des dépôts amyloïdes (d'après Braak & Braak, 1991)

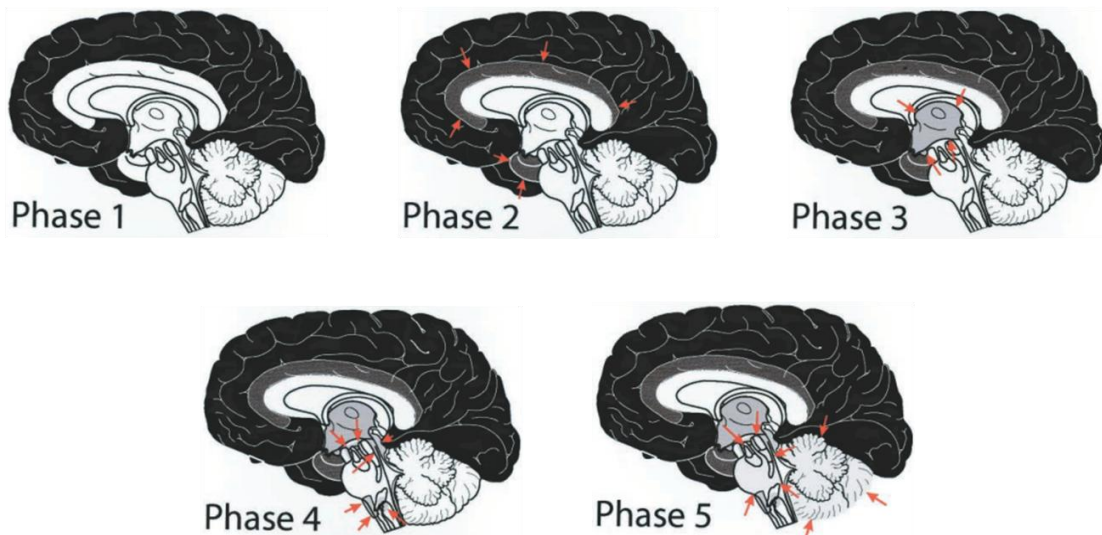


Figure 18 : Phases d'évolution des dépôts de peptide $A\beta$ (d'après Thal *et al.*, 2002)

Thal *et al.* (2002) ont identifié cinq stades (Figure 18) : le néocortex est impliqué au stade 1, puis l'hippocampe et le cortex entorhinal au stade 2, le striatum et le noyau diencephalique au stade 3. Ils touchent plus tard plusieurs noyaux du tronc cérébral au stade 4. Ils apparaissent enfin dans le cervelet ainsi que les autres noyaux du tronc cérébral au stade 5.

Les 5 phases apparaissent de façon successive et additive dans le néocortex, l'aire entorhinale et l'hippocampe, les noyaux sous-corticaux, le tronc cérébral et finalement le cervelet.

L'utilisation d'anticorps spécifiques du peptide A β a permis de distinguer divers dépôts amyloïdes.

- **Les dépôts diffus** (plaques primitives) sont les lésions amyloïdes qui apparaissent en premier, résultant de l'accumulation de peptide A β 42 (Barelli *et al.*, 1997). Ces dépôts sont irréguliers, peu denses, volumineux et relativement mal délimités au sein du parenchyme cérébral (Lalowski *et al.*, 1996). Ils peuvent être détectés chez des personnes âgées dépourvues de troubles intellectuels (Braak & Braak, 1992).
- **L'angiopathie amyloïde cérébrale** (AAC) résulte de l'accumulation du peptide amyloïde dans les vaisseaux sanguins des méninges et du cortex cérébral. Elle est associée avec la démence dans la MA, puisqu'environ 25% des patients atteints de la MA présentent aussi une AAC sévère (Attems *et al.*, 2007 ; Viswanathan & Greenberg, 2011). Contrairement aux dépôts diffus, elle comporte principalement du peptide A β 40 (Barelli *et al.*, 1997).
- **Les plaques séniles** (PS) ou plaques amyloïdes sont des dépôts extraneuronaux de forme sphérique composés d'un centre amyloïde, d'environ 10 à 20 μ m de diamètre et composé des deux formes de peptide A β (Barelli *et al.*, 1997), entouré d'une couronne de « prolongements neuritiques et axonaux en voie de dégénérescence » chargés en protéine Tau et de cellules microgliales activées et exprimant des protéines impliquées dans la réponse à l'inflammation, mais présentes à taux faible lors du vieillissement normal. Néanmoins, la présence des PS et des DNF en grande quantité dans les régions hippocampique et corticales (Figure 15e) est caractéristique des stades avancés de la MA (Delacourte, 1998 ; Corder *et al.*, 2004). La distribution des PS présente une grande variabilité interindividuelle d'une région cérébrale à l'autre (Braak & Braak, 1991). Cependant, la densité la plus élevée a été observée dans les couches II et III des lobes temporal et occipital (Duyckaerts *et al.*, 1986). La présence de ces plaques conduit à une perturbation du réseau synaptique (Kuchibhotla *et al.*, 2008), une réaction inflammatoire massive (Luccarini *et al.*, 2012), et joueraient un rôle dans la modification des fonctions et des propriétés neuronales (Busche *et al.*, 2008).

b. Diagnostic clinique

i. Évaluation neuropsychologique

Selon les directives européennes, six fonctions se doivent d'être évaluées au cours de l'examen de diagnostic d'une démence de type Alzheimer : les fonctions cognitives globales, la mémoire épisodique à long terme, les fonctions exécutives, les troubles neuropsychiatriques, les fonctions instrumentales et

les activités fonctionnelles de la vie quotidienne. Pour détecter ces troubles en consultation, il est recommandé (Waldemar *et al.*, 2007) d'utiliser les critères du DSM IV (*Diagnostic and Statistical Manual version IV*) et du NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurologic, Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*). Le DSM IV a pour objectif de détecter une démence. Il pose comme base pour le diagnostic de la MA la détection d'une altération de la mémoire épisodique (encodage et restitution des informations). Cette altération doit être associée à au moins l'un des troubles suivants : l'aphasie (problème de compréhension et/ou d'utilisation des mots), l'apraxie (trouble de l'exécution de tâches motrices complexes malgré des fonctions motrices intactes), l'agnosie (trouble de la reconnaissance d'objets familiers) ou des troubles exécutifs comme la planification des actions (d'après *Maladie d'Alzheimer, Enjeux scientifiques médicaux et sociétaux*, INSERM, 2007). Parallèlement aux critères du DSM-IV, les critères du NINCDS-ADRDA peuvent être utilisés, ceux-ci étant plus détaillés et sélectifs. Une MA probable se définit par la présence (i) d'un syndrome démentiel également diagnostiqué par une évaluation neuropsychologique, (ii) d'un déficit d'au moins deux fonctions cognitives, (iii) d'une altération progressive de la mémoire et des autres fonctions cognitives, (iv) d'une absence de troubles de la conscience, (v) d'une survenue entre 40 et 90 ans et (vi) de l'absence de désordres systématiques ou d'une autre maladie cérébrale pouvant être à l'origine de ces symptômes. En fonction de ces différents critères, la MA est définie alors comme possible ou probable (McKhann *et al.*, 1984).

À ce jour, un seul examen neuropsychologique est réalisé pour diagnostiquer une MA. Outre le test MMSE qui permet d'évaluer la sévérité du déficit cognitif grâce au calcul d'un score sur 30 points dépendant de l'âge et du niveau d'instruction (Folstein *et al.*, 1975), plusieurs autres tests psychométriques standardisés peuvent servir à cette évaluation, comme l'échelle de Blessed (Roth *et al.*, 1967), le GDS (*Global Deterioration Scale*, Reisberg *et al.*, 1982), l'ADAS-COG (*Alzheimer's Disease Assessment Scale – Cognition*, Rosen *et al.*, 1984) et le test ADL (*activities daily living*) qui repose quant à lui sur une évaluation des capacités du patient à répondre à des problèmes quotidiens (Desai & Grossberg, 2005). Cependant, le test MMSE demeure le test le plus utilisé, car il permet une évaluation rapide des fonctions cognitives et il est nécessaire au diagnostic d'un syndrome démentiel selon les critères du NINCDS-ADRDA. Quelle que soit la méthode d'évaluation, les résultats sont confrontés à des sources d'informations collatérales (famille, amis) pour étayer le diagnostic (Cacchione *et al.*, 2003) et affecter au patient un état parmi une liste prédéfinie : AAMI (*age-associated memory impairment*), AACD (*age-associated cognitive decline*) ou MCI. Les suivis cliniques révèlent que 10 à 12% des patients MCI évoluent vers un état prédémentiel caractéristique de la MA, au cours duquel le déclin cognitif est visible (Chong & Sahadevan, 2005 ; Forlenza *et al.*, 2010). Quatre-vingt pour cent d'entre eux convertissent leur état en MA dans les 6 ans qui suivent la mise en évidence de l'état MCI (Chong & Sahadevan, 2005). Ces résultats suggèrent que le stade MCI est bien un état précurseur de la MA, justifiant tout l'intérêt que portent de nombreuses équipes à identifier des marqueurs spécifiques et précoces de cette prédémence.

ii. Imagerie médicale

Ces dernières années, de nouveaux critères de diagnostic ont été proposés permettant d'établir un diagnostic avant même l'apparition de la démence. Ces critères s'appuient sur la combinaison d'observations résultant des connaissances les plus récentes sur la maladie. De nouveaux tests de mémoire plus spécifiques peuvent ainsi déceler des troubles mnésiques ayant pour origine une atteinte de l'hippocampe (Dubois *et al.*, 2007 & 2009). Les techniques d'imagerie cérébrale comme l'IRM (imagerie par résonance magnétique) ou la TEP (tomographie par émission de positons) peuvent respectivement mettre en évidence une atrophie de l'hippocampe (Colliot *et al.*, 2008) et un déficit du métabolisme glucidique cérébral qui, selon une méta-analyse regroupant 9 études, permettent de discriminer les patients atteints de MA des sujets témoins (Patwardhan *et al.*, 2004). L'imagerie en TEP permet aussi de visualiser divers composés se liant aux peptides A β , afin par exemple d'estimer la charge amyloïde du cerveau d'un patient de son vivant (Figure 19). Parmi ces composés, le PIB (composé B de Pittsburgh), dérivé de la thioflavine, est le plus souvent utilisé (Mathis *et al.*, 2003).

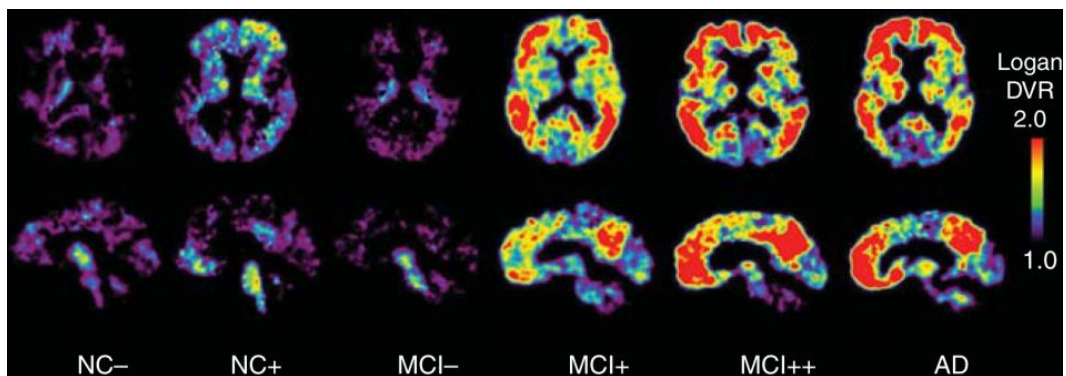


Figure 19 : Analyse par TEP de la progression des dépôts de peptides A β chez les sujets témoins, MCI et MA (d'après Johnson *et al.*, 2012)

Les zones bleues et violettes marquent un faible dépôt de peptides A β , alors que les zones rouges et jaunes marquent des dépôts de peptides A β importants colorés au PIB. (NC-) sujets témoins ne présentent aucun signe de dépôt de peptide β -amyloïde, (NC+) 25% de sujets témoins présentent ces dépôts. La majorité des patients MCI présentent des dépôts d'A β modérés (MCI+) ou sévères (MCI++), bien que 40 à 50% des patients à ce stade ne montrent pas de dépôt d'A β . Enfin, la grande majorité des sujets diagnostiqués cliniquement MA présentent des dépôts d'A β très sévères.

iii. Marqueurs biologiques

Le dosage de biomarqueurs spécifiques tels que la protéine Tau totale (Tau) ou phosphorylée (P-Tau) et les peptides amyloïdes A β 40 et A β 42, dans le liquide céphalorachidien (LCR) peut aussi évoquer la pathologie (Blennow *et al.*, 2010 & 2012 ; Okonkwo *et al.*, 2010). Ces résultats ont pu être confirmés par une étude multicentrique prospective (Mattsson *et al.*, 2009).

Les études *post mortem* réalisées sur des patients décédés de la MA ont permis de mettre en évidence que la diminution du taux de peptide A β 42 dans le LCR est bien corrélée avec l'accumulation des dépôts amyloïdes dans le néocortex et l'hippocampe. Cette diminution, probablement liée à une

séquestration de ce peptide au sein des plaques séniles et/ou à une diminution de sa clairance, peut atteindre 50% (Strozyk *et al.*, 2003). Ainsi, la quantification de ce marqueur permettrait de distinguer les patients souffrant de la MA de ceux atteints d'autres pathologies neurodégénératives – sclérose amyotrophique latérale et démences vasculaires (Sjögren *et al.*, 2002), démences frontotemporales à corps de Lewy (Andreasen *et al.*, 2001) – avec une sensibilité et une spécificité de plus de 80% (Blennow *et al.*, 2012). Parallèlement, plusieurs études ont montré que l'augmentation du taux de Tau chez les patients atteints de MA est plus importante que celle observée lors du vieillissement normal. P-Tau permettrait de mieux distinguer les patients atteints de la MA de ceux atteints de la maladie de Creutzfeld-Jakob, de démences frontotemporales ou à corps de Lewy (Parnetti *et al.*, 2006). Ainsi, une analyse reposant sur 11 études différentes incluant environ 350 contrôles et 700 patients atteints de la MA, a montré une augmentation du taux de Tau phosphorylée chez les patients Alzheimer avec une spécificité estimée à 92% et une sensibilité moyenne de 80% (Blennow & Hampel, 2003).

En plus de ces biomarqueurs qui semblent faire consensus, le dosage d'autres protéines dans le LCR a été proposé pour diagnostiquer la pathologie. Ainsi, l'enzyme ornithine trans-carbamylyase a été mise en évidence spécifiquement dans le LCR de patients déments (Bensemain *et al.*, 2009). Lewczuk *et al.* (2010) ont noté dans le LCR des malades une augmentation significative de la partie sécrétée du précurseur du peptide amyloïde (APPs) cohérente avec le résultat des dosages de Tau, P-Tau et A β 42. Ces résultats ont été confortés récemment chez la souris et chez l'homme à partir d'un prélèvement de 0,5 μ l de LCR, suffisante pour effectuer le diagnostic (Rose *et al.*, 2012).

Afin de s'affranchir des effets secondaires redoutés suite au prélèvement du LCR par ponction lombaire, d'autres études se sont penchées sur le dosage de biomarqueurs plasmatiques tels que les cytokines ou d'autres molécules pro-inflammatoires (Ray *et al.*, 2007). Plusieurs études prospectives récentes ont montré une association entre le ratio A β 42/A β 40 plasmatique et le risque de développer une démence (van Oijen *et al.*, 2006 ; Graff-Radford *et al.*, 2007 ; Lambert *et al.*, 2009). Mais ces résultats sont très discutés, d'autres études ne montrant aucune corrélation (Hansson *et al.*, 2012).

Bien que l'utilisation de ces nouveaux outils de diagnostic ne soit pas généralisée et encore trop souvent restreinte à des services spécialisés, ils constituent un espoir important dans l'amélioration du diagnostic de la MA.

5. La protéine APP, précurseur du peptide amyloïde

APP est une glycoprotéine de 110 à 140 kDa exprimée dans de nombreux types tissulaires, en particulier dans les neurones cérébraux, à partir d'un gène situé sur le bras long du chromosome 21. Sa structure protéique générale (Figure 20) comprend un grand domaine extracellulaire (ectodomaine), un domaine transmembranaire hydrophobe et un court domaine cytoplasmique (Kang *et al.*, 1987). Ce gène code plusieurs glycoprotéines transmembranaires longues de 695 à 770 acides aminés. Les isoformes

principales sont APP695, APP751 et APP770, distinguées principalement par l'absence (APP695) ou la présence (APP750 et APP770) d'un domaine de liaison aux inhibiteurs de protéase Kunitz (KPI) à proximité de l'extrémité *N*-terminale de la protéine. Les neurones expriment plus particulièrement la protéine APP695 trouvée en forte quantité dans le cerveau. Au cours de sa maturation, la protéine APP subit différentes modifications post-traductionnelles : *N*- et *O*-glycosylations, phosphorylations et sulfatations. Elle peut être sécrétée ou rester ancrée à la membrane (Selkoe, 2001).

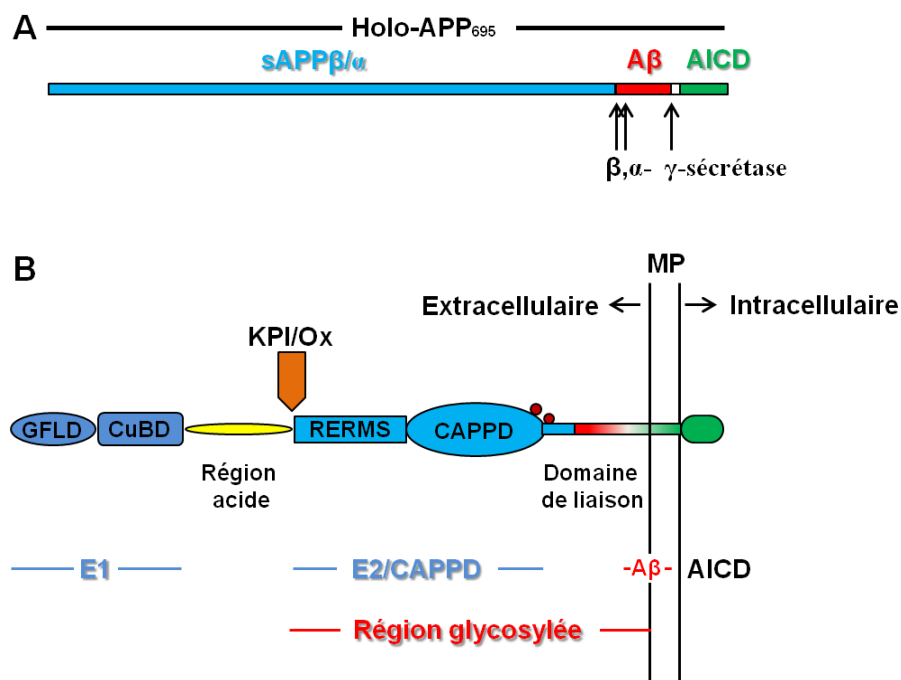


Figure 20 : Représentation schématique de l'APP695 humaine (d'après Reinhard *et al.*, 2005)
 (A) Sites de clivage des sécrétases, (B) Organisation des domaines d'APP695

- **L'ectodomaine** de l'APP est une structure complexe qui comprend le domaine GFLD (*growth factor-like domain*), suivi par un domaine de liaison au cuivre (CuBD) capable de réduire le Cu^{2+} en Cu^+ (Reinhard *et al.*, 2005). Ces deux domaines constituent ensemble le domaine E1 qui favorise l'adhérence cellulaire et les interactions cellules-cellules (Soba *et al.*, 2005), ce qui a conduit à suggérer que la protéine APP pourrait exercer de telles fonctions biologiques. E1 est connecté à une région acide flexible, puis la région glycosylée qui comprend deux sous-régions, le domaine E2 également appelé CAPPD (domaine central de l'APP) et le domaine de liaison (Figure 20). E2 est la partie la plus importante, permettant à la protéine APP d'interagir avec les différents partenaires protéiques (Reinhard *et al.*, 2005) et d'exercer une activité neurotrophique par sa séquence RERMS (Li *et al.*, 1997).
- **La région transmembranaire (TM)** est importante pour la maturation protéolytique de la protéine par la γ -sécrétase.
- **Le domaine cytoplasmique AICD** (domaine intracellulaire de l'APP) pourrait jouer un rôle de facteur de transcription.

La protéine APP est métabolisée selon deux voies se distinguant principalement par les protéases impliquées et les métabolites produits. La voie non amyloïdogène est caractérisée par deux clivages endoprotéolytiques séquentiels catalysés par :

- une α -sécrétase qui libère le fragment *N*-terminal soluble sAPP α , doué de propriétés neuroprotectrices et anti-apoptiques (Chasseigneaux & Allinquant, 2012), et le fragment *C*-terminal C83 (ou α CTF), constitué d'une portion tronquée du peptide A β et de la partie cytoplasmique de l'APP (Figure 21a) ;
- puis une γ -sécrétase qui isole le fragment p3 de 3 kDa, sécrété par la cellule, de la partie cytoplasmique C59 (Figure 21a).

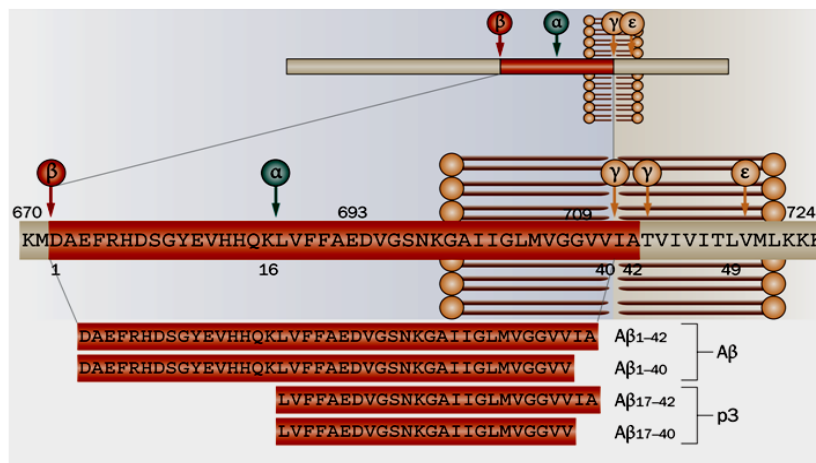
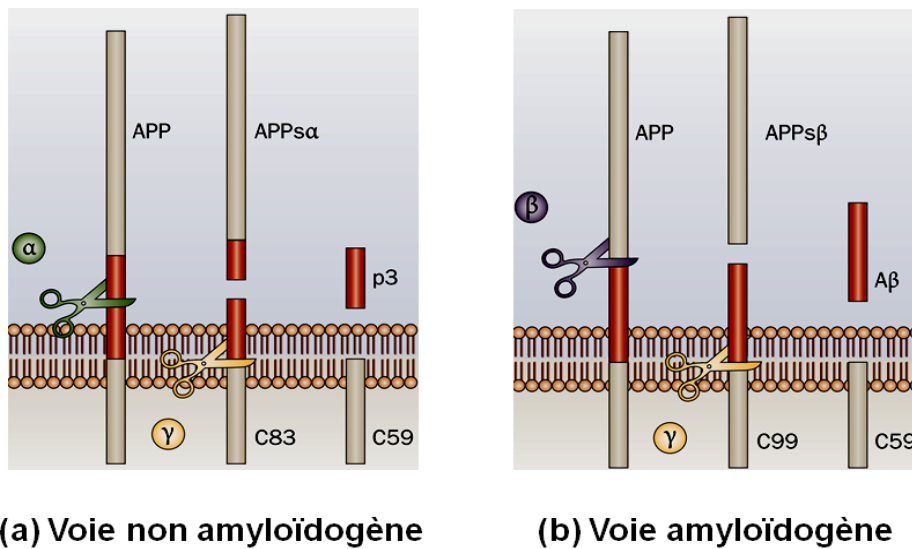


Figure 21 : Schéma de l'action des sécrétases (d'après De Strooper *et al.*, 2010)

Schéma de l'action des sécrétases (a) maturation physiologique de l'APP, (b) maturation pathologique de l'APP, (c) résidus d'acides aminés où les différentes sécrétases clivent l'APP et génèrent différents peptides A β .

En conditions physiologiques, la maturation protéolytique de la protéine APP fait majoritairement intervenir le clivage au site α qui l'oriente ainsi vers la voie non amyloïdogène (Esch *et al.*, 1990).

La β -sécrétase est théoriquement en compétition avec l' α -sécrétase pour cliver la protéine substrat APP. La voie amyloïdogène est donc privilégiée lorsque cette compétition est en faveur de la β -sécrétase, comme lorsque la protéine APP, synthétisée à partir d'allèles mutés, présente des séquences particulières plus efficacement reconnues par cette protéase et favorisant de fait la production et donc l'accumulation du peptide A β dans le cerveau des patients atteints de la forme familiale à survenue précoce de MA. En coupant avant le premier résidu du peptide A β , la β -sécrétase conduit à la sécrétion du fragment *N*-terminal sAPP β , plus court que sAPP α , et à la formation du fragment *C*-terminal C99 (β CTF), constitué de la séquence d'A β et de la queue cytoplasmique. Le clivage par la γ -sécrétase libère le peptide A β , qui est ensuite sécrété par la cellule (Figure 21b). En raison de la présence de sites alternatifs de coupure par les β - et γ -sécrétases, des peptides de longueur variant de 32 à 43 acides aminés peuvent être produits, les formes principales étant les peptides A β 40 et A β 42 (Figure 21c).

Chez les mammifères, deux protéines apparentées à APP existent, nommées APLP1 et APLP2 (*APP-like protein*), métabolisées de façon sensiblement identique à APP puisqu'elles sont aussi reconnues par les α -, β - et γ -sécrétases. De façon intéressante, elles ne génèrent pas de peptide amyloïde (De Strooper & Annaert, 2000), mais un peptide *p3-like* qui ne s'agrège pas et qui, au moins *in vitro*, n'est pas toxique (Minogue *et al.*, 2009).

a. Implication des sécrétases dans le clivage de la protéine APP

L' α -sécrétase clive APP au milieu de la séquence correspondante aux peptides A β empêchant sa formation (Esch *et al.*, 1990). Le clivage d'APP par cette enzyme représente donc un mécanisme anti-amyloïdogène de tout premier ordre. La stimulation de l'activité α -sécrétase représenterait donc une voie thérapeutique intéressante pour diminuer la production du peptide A β , mais la diversité des processus dans lesquels les α -sécrétases sont impliquées risque d'entraîner des effets indésirables. L'activité α -sécrétase repose principalement sur ADAM10 (*A Disintegrin And Metalloprotease*), une métalloprotéase membranaire (Lammich *et al.*, 1999 ; Jorissen *et al.*, 2010). Deux autres protéases, ADAM9 et ADAM17, ont aussi été caractérisées comme α -sécrétases (Asai *et al.*, 2003). Ces enzymes sont majoritairement présentes sous forme inactive dans le réseau trans-golgien et sous forme active à la membrane plasmique (Lammich *et al.*, 1999). *In vivo*, ADAM10 pourrait passer de la membrane plasmique pré-synaptique à la membrane plasmique post-synaptique en interagissant avec SAP97, une protéine associée aux synapses et qui régulerait l'activité α -sécrétase (Marcello *et al.*, 2007). La perturbation de cette interaction pourrait mener au développement d'une MA (Epis *et al.*, 2010).

La β -sécrétase clive la protéine APP au niveau de l'extrémité *N*-terminale du peptide A β . Le gène codant pour l'enzyme, de type aspartylprotéase, responsable de l'activité β -sécrétase a été identifié et cloné par diverses équipes (Hussain *et al.*, 1999 ; Sinha & Lieberburg, 1999 ; Vassar *et al.*, 1999 ; Yan *et al.*, 1999). Le nom BACE1 a finalement été retenu pour nommer cette protéine à partir de son activité enzymatique clivant APP au site β . Exprimée majoritairement dans les neurones, BACE1 présente une

homologue, BACE2, peu abondante au niveau cérébral et ne contribuant pas ou peu à la production du peptide A β (Ahmed *et al.*, 2010). Par contre, la mutation « *Swedish* » de la protéine APP humaine (hAPP^{swe}, K595N/M596L) augmente de 10 à 100 fois l'activité de BACE1 (Vassar *et al.*, 2009).

BACE1 est synthétisée dans le réticulum endoplasmique sous une forme inactive qui doit subir plusieurs modifications post-traductionnelles. Elle est ainsi activée dans l'appareil de Golgi par la furine convertase, puis migre vers les compartiments tels que le réseau trans-golgien et les endosomes dans lesquels règne un pH acide nécessaire à son activité catalytique, avant de terminer son trafic dans le lysosome où elle est dégradée (Vassar *et al.*, 2009 ; Kandalepas & Vassar, 2012). Inhiber BACE1 apparaît donc comme un objectif thérapeutique prioritaire contre la MA pour empêcher la production de peptide A β , d'autant que les souris KO déficientes en BACE1 ne semblaient présenter aucun phénotype particulier. Cet objectif pourrait toutefois devoir ne pas être suivi, puisque des travaux récents ont révélé que les souris BACE1-KO souffrent de désordres synaptiques et de problèmes comportementaux de type schizophrénie (Vassar *et al.*, 2009).

La γ -sécrétase intervient donc après l'action de la β -sécrétase ou des α -sécrétases pour catalyser la protéolyse dans la bicouche membranaire des fragments C-terminaux générés, C99/C89 ou C83 respectivement. Bien que portant l'activité catalytique responsable de ce clivage, les présénilines PS1 et PS2 ne peuvent pas agir seules et nécessitent la formation d'un complexe de 4 protéines transmembranaires (Figure 22) dans lequel elles sont chacune associées à la nicastrine et aux protéines Pen 2 (*presenilin enhancer 2*) et Aph-1 (De Strooper *et al.*, 2012).

L'activité γ -sécrétase de ce complexe a été détectée dans la membrane plasmique, au niveau des synapses, ainsi que dans certaines endomembranes parmi lesquelles celles du RE, de l'appareil de Golgi et du réseau trans-golgien, des endosomes et des mitochondries (Capell *et al.*, 2005 ; Area-Gomez *et al.*, 2009 ; Frykman *et al.*, 2010). Ce complexe coupe les fragments C-terminaux de la protéine APP en deux sites privilégiés γ et ϵ . Le modèle proposé par Qi-Takahara *et al.* (2005) suggère un clivage au niveau du site ϵ qui libère la contrepartie intracellulaire AICD, puis par clivages successifs la formation de peptides amyloïdes de différentes tailles dont les majoritaires sont les peptides A β 40 et A β 42. L'invalidation de l'un ou l'autre des quatre partenaires résultant en la réduction importante de la production de peptide amyloïde, le complexe a été considéré comme une cible thérapeutique de choix (De Strooper *et al.*, 2012). Cependant, tout comme pour BACE1, le complexe γ -sécrétase est impliqué dans le clivage et la régulation d'une grande variété de protéines membranaires comme p75 et Notch, impliquées dans des fonctions essentielles comme l'adhésion et la prolifération cellulaire, l'homéostasie du calcium, le transport vésiculaire et l'activité neuronale (Vetrivel *et al.*, 2006 ; De Strooper *et al.*, 2012). L'inhibition de l'activité γ -sécrétase pourrait donc entraîner des effets secondaires indésirables, ce qui a conduit des chercheurs liégeois à mettre au point des inhibiteurs peptidiques de γ -sécrétase capables d'inhiber sélectivement, sans doute par empêchement stérique, la production *in vitro* du peptide A β , sans altérer la maturation de Notch (Serneels *et al.*, 2009 ; Esselens *et al.*, 2012).

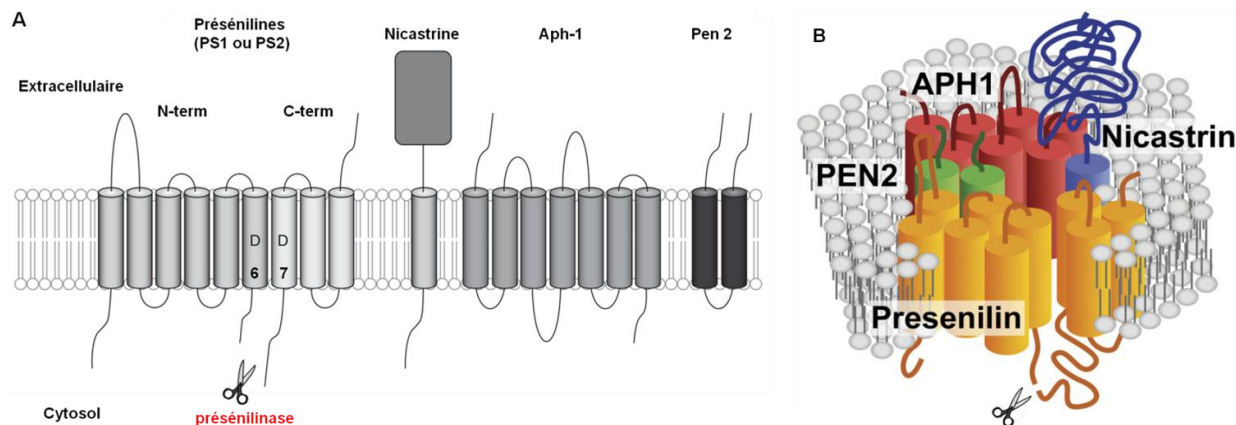


Figure 22 : Représentation schématique du complexe γ -sécrétase

(A) Complexe γ -sécrétase éclaté (d'après De Strooper et al., 2012), (B) Complexe γ -sécrétase assemblé (d'après Parks & Curtis, 2007). La préséniline est maturée par la présénilinase qui clive l'holoprotéine au niveau de la boucle cytosolique entre les domaines transmembranaires D6 et D7 qui contiennent en leur centre les 2 résidus aspartate censés former le couple catalytique. Ceci conduit à la formation de deux fragments N- et C-terminaux appariés en un hétérodimère qui forme l'entité biologiquement active des présénilines au sein du complexe.

b. Localisation et fonction de la protéine APP et de ses dérivés

La protéine APP neuronale est transportée vers les synapses rapidement après sa synthèse (Koo *et al.*, 1990). Elle est aussi localisée dans les cônes de croissance neuronale, les neurites et les axones (Ferreira *et al.*, 1993 ; Sabo *et al.*, 2003). Au niveau cellulaire, la protéine APP peut être localisée dans différents organites (Figure 23), comme le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, la membrane plasmique, les endosomes et les lysosomes (Brunholz *et al.*, 2012 ; Haass *et al.*, 2012).

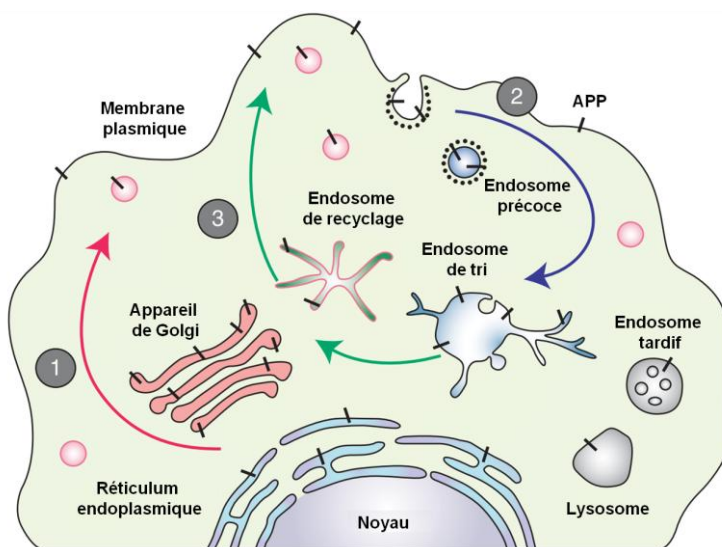


Figure 23 : Trafic intracellulaire de la protéine APP (d'après Haass *et al.*, 2012)

Après avoir atteint la membrane, la protéine APP peut être ré-internalisée et soumise à des clivages dans les lysosomes (Haass *et al.*, 1992). La voie de clivage conduisant au peptide A β est principalement située dans le système endosomal/lysosomal et à la surface cellulaire (Pasternak *et al.*, 2004), alors que le clivage non amyloïdogène conduisant au peptide p3 intervient surtout à la surface cellulaire (Parvathy *et al.*, 1999).

La fonction biologique de la protéine APP est jusqu'à présent encore mal connue. Des souris APP^{-/-} ont été conçues pour tenter d'identifier les activités cellulaires auxquelles la protéine participe. Bien que viables et fertiles, ces souris présentent certaines anomalies parmi lesquelles un défaut global de croissance avec un poids nettement inférieur à celui des souris sauvages, un développement cérébral altéré et une diminution des activités locomotrices. De plus, ces souris APP-KO montrent une activation des cellules gliales et une détérioration des fonctions cognitives (Dawson *et al.*, 1999 ; Seabrook *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 2005). La protéine APP a été très récemment impliquée dans l'adhésion et la croissance cellulaire (Chen & Dou, 2012). Des études *in vitro* montrent son rôle sur la croissance des dendrites (Young-Pearse *et al.*, 2008) et la synaptogenèse (Wang *et al.*, 2009). D'autres activités ont été aussi décrites, notamment une fonction anti-apoptotique (Xu *et al.*, 1999).

Les fragments issus du clivage protéolytique d'APP possèdent aussi un rôle physiologique. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les clivages par les α - et β -sécrétases libèrent respectivement les fragments sAPP α et sAPP β dans le milieu extracellulaire. sAPP α possède des propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices, puisqu'il est capable *in vitro* de stimuler la survie neuronale et la croissance des dendrites de manière dose-dépendante (Araki *et al.*, 1991). sAPP α intervient aussi dans la régulation de l'excitabilité neuronale et la plasticité synaptique. Ces deux activités contrôlent la teneur en calcium intracellulaire des neurones (Mattson, 1994). Les effets neuroprotecteurs de sAPP α ont été rapportés dans un modèle *ex vivo* obtenu par une culture organotypique de tranches d'hippocampe, où elle pourrait induire l'expression de différents gènes neuroprotecteurs et protéger contre la toxicité du peptide A β (Stein *et al.*, 2004). *In vivo*, sAPP α augmente la densité synaptique, améliore la mémoire à court et à long terme (Meziane *et al.*, 1998 ; Taylor *et al.*, 2008), et favorise la neurogenèse dans la zone subventriculaire chez les souris adultes (Caillé *et al.*, 2004; Demars *et al.*, 2011). De plus, l'expression de sAPP α chez des souris APP-KO est capable de corriger les nombreuses anomalies dont elles souffrent (Ring *et al.*, 2007). Ces activités neurotrophiques et neuroprotectrices passeraient par un ou plusieurs sites de liaison à l'héparine présent sur sAPP α (Corrigan *et al.*, 2011). À l'inverse, le fragment sAPP β ne possède pas ce site de liaison à l'héparine et par conséquent ne présente pas les mêmes activités (Furukawa *et al.*, 1996). Contrairement à sAPP α , sAPP β ralentit la croissance des neurites (Li *et al.*, 1997). Une étude récente a mis en évidence un clivage de sAPP β générant un fragment N-terminal de 35 kDa capable de se lier à un récepteur de mort (DR6), activant en conséquence les caspases et induisant la dégénérescence des axones et des neurones (Nikolaev *et al.*, 2009).

Les fragments C-terminaux d'APP, α CTF et β CTF, sont respectivement générés par les α - et β -sécrétases, puis immédiatement coupés par la γ -sécrétase. La demi-vie très courte des CTF rend l'étude de leur rôle propre très difficile. Cependant, le fragment α CTF a été montré capable d'inhiber la γ -sécrétase et diminuer la production d'A β (Tian *et al.*, 2010). Des résultats *in vitro* suggèrent à l'inverse un rôle neurotoxique des β CTF indépendant de A β (Lee *et al.*, 2000).

Le domaine AICD intracellulaire d'APP est obtenu à partir des précurseurs α CTF et β CTF. Il est très difficile de l'observer dans le cerveau en raison de sa petite taille et surtout de sa dégradation rapide. Ghosal *et al.* (2009) ont néanmoins réussi à en déceler un niveau plus élevé dans le cerveau des malades d'Alzheimer. Plus de vingt protéines susceptibles d'interagir avec AICD ont été proposées, pouvant être impliquées dans le transport axonal, la transcription et l'apoptose (Müller *et al.*, 2008 ; Ohkawara *et al.*, 2011). L'interaction avec la protéine adaptatrice Fe65 est la plus étudiée. Elle participerait à la formation d'un complexe ternaire AICD/FE65/TIP60 (Cao & Südhof, 2001) pouvant réguler l'activité transcriptionnelle de certains gènes comme *GSK3 β* , *caspase 6*, *p53* et *LRP1* (Müller *et al.*, 2008). Des études *in vivo* montrent que AICD entraîne une augmentation de l'activité de la GSK3 β et la phosphorylation de Tau, induisant une diminution de la mémoire à court terme et du nombre de neurones hippocampiques (Ghosal *et al.*, 2009). Enfin, le domaine AICD est probablement capable d'inhiber la neurogenèse chez les animaux adultes et de favoriser la neuroinflammation (Ghosal *et al.*, 2010).

Le peptide bêta-amyloïde ou A β a été très largement étudié par rapport au fragment P3. A β est présent aux niveaux intra- et extracellulaires où ses actions seraient différentes. À ces deux premières sources de diversité s'ajoute la conformation des peptides A β : monomères ou oligomères, solubles ou non, fibrillaires ou agrégés, dépôts..., les oligomères et les fibrilles pouvant aussi être solubles ou insolubles. Ces différents facteurs montrent que le peptide A β peut se présenter sous des états physiques très divers, interdépendants les uns des autres, ce qui pourrait expliquer la multitude des rôles physiopathologiques attribués à ce peptide.

6. Les oligomères solubles de peptide A β

La cascade amyloïde représente sans aucun doute un élément important dans le développement de la MA. Sa mise en évidence a été le support de la démonstration du lien étroit existant entre la pathologie de la MA et le peptide A β (Hardy & Higgins, 1992 ; Hardy & Selkoe, 2002). Cependant, les différentes atteintes tissulaires et cellulaires observées lors du développement de la MA ne peuvent pas être expliquées uniquement par cette théorie. En effet, au niveau clinique, les premiers signes de démence ne coïncident pas avec l'apparition des plaques séniles (Katzman *et al.*, 1988 ; Terry *et al.*, 1991). De plus, comme l'a montré Alzheimer, des phénomènes neurodégénératifs ont été observés en absence de plaques amyloïdes (Cochran *et al.*, 1991) et des plaques séniles ont été retrouvées chez des sujets très âgés qui ne présentaient pourtant aucune signe de démence (Delaère *et al.*, 1993). Il convient d'ajouter à cela le fait que les troubles cognitifs apparaissent très nettement avant la détection des premières plaques séniles même chez des souris transgéniques modèles de la MA (Mucke *et al.*, 2000 ; Koistinaho *et al.*, 2001 & 2002). De même, la perte de mémoire a pu être réversée chez ces souris ayant bénéficié d'une administration d'anticorps anti-A β sans qu'aucune plaque amyloïde ne disparaisse (Dodart *et al.*, 2002). Plusieurs équipes, dont la nôtre sous l'impulsion initiale de Thierry Pillot, ont développé une hypothèse alternative bien plus réaliste et conforme aux dernières connaissances fondamentales et cliniques acquises. Cette hypothèse place les oligomères solubles de peptide A β ou

A β O, définis comme les espèces restant dans le surnageant après ultracentrifugation à 100.000 x g durant 1 h (Kuo *et al.*, 1996), au cœur des processus neurodégénératifs associés aux phases précliniques de la MA (Drouet *et al.*, 2000; Tabaton & Piccini, 2005). Selon cette hypothèse, ces A β O présentent l'état physique le plus cohérent pour provoquer une synaptotoxicité, une neuroinflammation, un stress oxydant et une dégénérescence neuronale qui définissent le syndrome conduisant à la MA.

7. La toxicité des A β O

L'hypothèse de la cascade amyloïde est aujourd'hui reconsidérée au profit de l'implication des A β O très toxiques dans les troubles associés à la MA. Grâce à leurs propriétés fusogènes (Pillot *et al.*, 1996), les A β O interagissent avec la bicouche lipidique, principalement au niveau synaptique (Lacor *et al.*, 2004 & 2007), ce qui semble le tout premier événement d'une série menant à la perte synaptique, puis à la dégénérescence et la mort neuronales, entraînant les premiers troubles de l'apprentissage et de la mémoire. Ainsi, l'injection de quantités sub-nanomolaires d'oligomères A β solubles dans le ventricule latéral de rat ou de souris peut inhiber le processus de potentialisation à long terme sur lequel s'appuient les mécanismes de mémoire et de plasticité synaptique (Walsh & Selkoe, 2004 ; Youssef *et al.*, 2008 ; Garcia *et al.*, 2010). Les mécanismes de l'interaction des A β O avec la membrane sont toujours mal connus, mais deux hypothèses sont généralement admises (Figure 24).

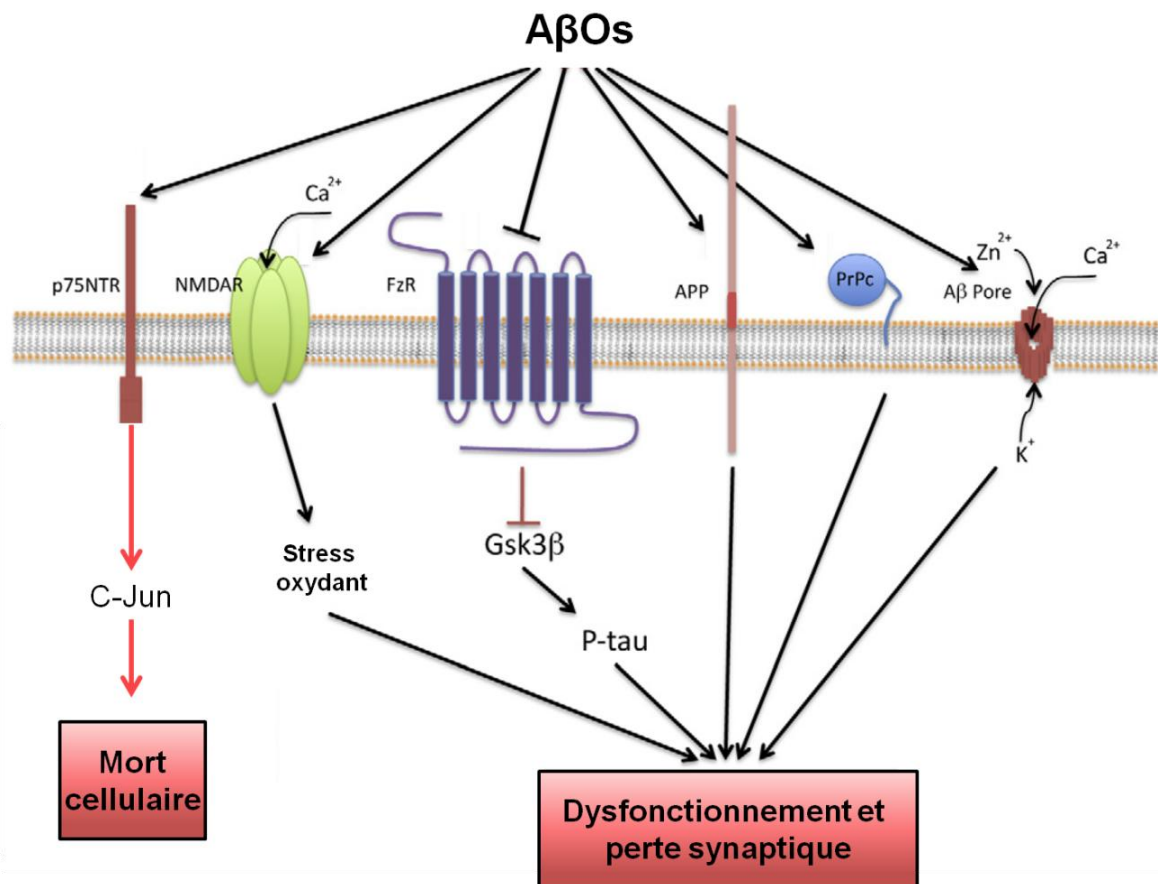


Figure 24 : Mécanismes d'interaction d'A β O avec la membrane neuronale (d'après Pozueta *et al.*, 2012)

- Des pores membranaires non sélectifs pourraient être formés à cause des propriétés hydrophobes des oligomères, ce qui induit une perte de l'homéostasie ionique de la cellule. Cette hypothèse propose un lien direct entre les A β O et les perturbations du métabolisme calcique conduisant aux dysfonctionnements cellulaires puis à la mort cellulaire (Demuro *et al.*, 2005 ; Glabe, 2006).
- Les oligomères A β pourraient interagir avec un récepteur membranaire responsable de l'internalisation du peptide A β ou de l'activation de voies de signalisations cellulaires. Cette hypothèse a été mise en évidence par Lambert *et al.* (1998) dont les travaux ont montré que le peptide A β interagit moins avec la membrane des cellules traitées par la trypsine, suggérant l'implication de protéines membranaires. Depuis, de nombreuses candidates ont été proposées, parmi lesquelles le récepteur RAGE (récepteur aux AGE) (Yan *et al.*, 1996) le récepteur aux neurotrophines p75NTR (Coulson, 2006), le récepteur NMDA (De Felice *et al.*, 2007 ; Decker *et al.*, 2010b ; Costa *et al.*, 2012), le récepteur AMPA (Zhao *et al.*, 2010), le récepteur Frizzled (Fz) (Magdesian *et al.*, 2008) et la protéine du prion cellulaire PrP^c (Laurén *et al.*, 2009).

Quelle que soit l'hypothèse proposée, la membrane neuronale constitue très certainement un niveau clé de l'interaction du peptide avec la cellule et de l'initiation de la cascade cytotoxique enclenchée en conséquence. Cette interaction pourrait donc être modulée selon les propriétés physicochimiques et la microorganisation de la bicouche, puisque le contenu membranaire en cholestérol, déterminant la fluidité membranaire, est apparu un élément important dans la neurotoxicité d'A β (Sponne *et al.*, 2004).

a. Mécanismes de toxicité induits par les A β O

i. Réponse inflammatoire et conséquences neurodégénératives

La présence de microglies et d'astrocytes activés au voisinage des plaques amyloïdes témoigne d'une réponse inflammatoire associée au dépôt des agrégats (Streit, 2004). Activés par les plaques séniles amyloïdes, les microglies libèrent des cytokines et autres médiateurs de l'inflammation. Cette réponse inflammatoire génère des effets protecteurs, mais également des effets pathologiques liés à la toxicité de certaines cytokines sécrétées comme le facteur de nécrose tumorale TNF- α ou l'IL-1.

Cependant, le processus inflammatoire pourrait être initié de façon précoce dans la MA et les A β O pourraient jouer un rôle clé, montrés capables d'activer la microglie à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Maezawa *et al.*, 2011). Les oligomères A β sont des activateurs de cellules gliales plus puissants que les fibrilles (Michelucci *et al.*, 2009). Il a été montré également au sein de notre laboratoire qu'une exposition *in vitro* des neurones aux A β O active en quelques dix minutes la phospholipase A₂ cytosolique (cPLA₂) et en conséquence la libération d'acide arachidonique (ARA ; C20:4, *n*-6), acide gras précurseur des éicosanoïdes, les médiateurs de l'inflammation (Kriem *et al.*, 2005). La libération d'ARA induit aussi l'activation des sphingomyélinases et la libération de céramides (Malaplate-Armand *et al.*, 2006). Ces événements sont déterminants dans la cascade apoptotique, leur inhibition protégeant les cellules contre la mort induite par les A β O (Figure 25).

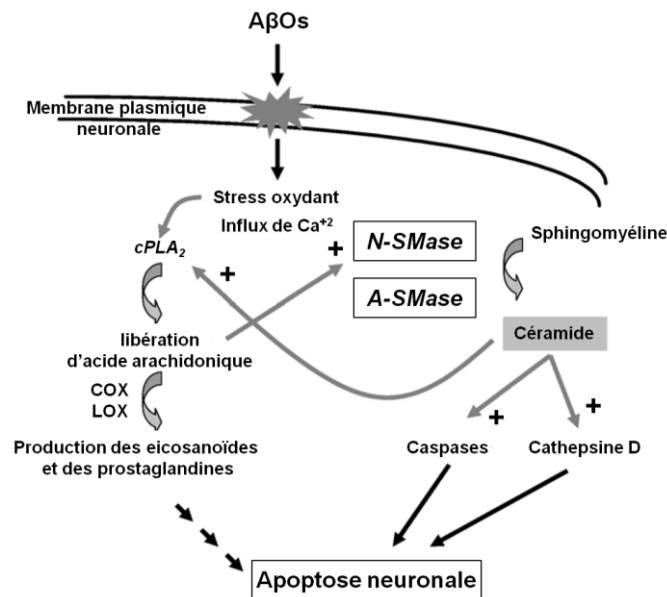


Figure 25 : Cascade de signalisation pro-apoptotique induite par les oligomères d'Aβ (d'après Malaplate-Armand *et al.*, 2006)

L'interaction du peptide Aβ avec la membrane conduit à l'induction d'un stress oxydant et à l'activation de la cPLA₂, ce qui induit, par conséquent, une libération précoce d'acide arachidonique. Ce dernier génère les eicosanoïdes et les prostaglandines, métabolites pro-inflammatoires, sous l'action des cyclooxygénases (COX) et lipoxygénases (LOX). Ainsi, ces événements capables d'activer les sphingomyélinases (SMases), générant ainsi les céramides qui activeraient finalement la cathepsine D et les caspases.

ii. Stress oxydant

Comme nous l'avons mentionné ci-dessous, le stress oxydant se manifeste par l'oxydation de protéines et la peroxydation de lipides conduisant à une altération structurale et fonctionnelle des tissus. Le SNC est particulièrement sensible aux ERO, en raison de sa richesse en AGPI et son besoin élevé en oxygène, ainsi que de la faible concentration en antioxydants. Le rôle du stress oxydant dans la MA a été nettement établi (Markesbery, 1997 ; Christen, 2000 ; Smith *et al.*, 2000) et les AβOs apparaissent comme des acteurs de premier ordre dans son apparition (De Felice *et al.*, 2007 ; Decker *et al.*, 2010a).

Selon un modèle développé par Varadarajan *et al.* (2000), les AβOs s'inséreraient dans la membrane plasmique des neurones et des cellules gliales et y généreraient des ERO, induisant une oxydation des protéines et une peroxydation des lipides membranaires. Cette altération se traduirait par une désorganisation de la membrane plasmique, conduisant à différents processus critiques, notamment une perte de l'homéostasie du calcium, un dysfonctionnement des récepteurs de certains neurotransmetteurs, une perte de fonction de certaines protéines de transport et une altération de la signalisation cellulaire pouvant conduire à l'activation de facteurs de transcription ou à des processus d'apoptose. Des études *in vitro* ont montré que les AβOs pourraient perturber les membranes mitochondriales et les enzymes de la chaîne respiratoire et générer ainsi des ERO de façon précoce, préalablement à l'activation des enzymes protéolytiques caspases et calpaïnes et à la désorganisation du cytosquelette (Sponne *et al.*, 2003 ; Fifre *et al.*, 2006).

Plusieurs auteurs préconisent aujourd'hui l'utilisation d'antioxydants, tant à titre préventif que pour traiter la MA. Des études *in vitro* et *in vivo* ainsi que divers rapports épidémiologiques suggèrent en effet que les composés polyphénoliques pourraient présenter un intérêt dans la prévention et/ou le traitement de la MA (Shukitt-Hale *et al.*, 2008 ; Miller & Shukitt-Hale, 2012), confortant l'intérêt préventif d'un régime alimentaire riche en fruits et légumes.

iii. Synaptotoxicité

Une fois intégrés dans la membrane neuronale, les A β O_s déclenchent plusieurs processus pathologiques, dont certains provoquent un dysfonctionnement neuronal comme l'hyperphosphorylation de Tau (Shipton *et al.*, 2011) et la déficience du transport axonal des organites (Decker *et al.*, 2010b), et d'autres touchent spécifiquement les synapses comme l'inhibition de la LTP (Lambert *et al.*, 1998 ; Walsh *et al.*, 2002 ; Walsh & Selkoe, 2004 ; Shankar *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2011).

En effet, les A β O_s d'origine synthétique ou extraits de cerveaux ou de liquide céphalorachidien de patients atteints de MA exercent leur toxicité en se liant au niveau synaptique. Ils interagissent avec les sites post-synaptiques riches en protéine PSD95 de cellules hippocampiques en culture (Gong *et al.*, 2003 ; Lacor *et al.*, 2004). Les synapses excitatrices semblent être une cible préférentielle, puisque les A β O_s colocalisent avec PSD95 mais pas avec la géphyrine, une protéine d'échafaudage des synapses inhibitrices (Renner *et al.*, 2010). De plus, l'interaction des A β O_s au niveau synaptique provoque une perte synaptique accompagnée d'une modification de la morphologie des synapses. Ils induisent une réduction des épines dendritiques minces et en forme de champignon, ainsi que la formation d'épines dendritiques aberrantes (Lacor *et al.*, 2007). Ces perturbations pourraient être à l'origine de la perte de plasticité synaptique et des troubles de mémoire sans perte neuronale survenant lors des stades précoces de la MA (Lambert *et al.*, 1998).

L'ensemble de ces données plaide donc très clairement en faveur de l'implication neurotoxique précoce et centrale des A β O_s dans le développement de la MA. Cet impact néfaste est une cible intéressante pour les stratégies thérapeutiques visant à prévenir la synaptotoxicité et la neurotoxicité induites par le peptide A β .

b. Processus de fibrillogénèse

Les peptides amyloïdes sous forme monomérique ne présentent que peu ou pas de toxicité, et même pour A β 40, un phénotype protecteur jusqu'à des concentrations de 20 μ M à condition qu'il reste à l'état de monomère (Zou *et al.*, 2003). Les monomères peuvent s'assembler en oligomères, puis ceux-ci peuvent s'associer en protofibrilles qui devenues fibrilles peuvent former les plaques. Les oligomères sont les entités qui semblent porter la toxicité maximale et induire les principales altérations qui conduiront à la dégénérescence neuronale. L'oligomérisation du peptide amyloïde apparaît donc comme une étape initiale critique de la fibrillogénèse. Elle nécessite que les peptides A β aient préalablement adopté une structure en feuillets β (Morgan *et al.*, 2004 ; Mousseau & Derreumaux, 2005).

Différents types d'oligomères A β solubles ont été caractérisés (Walsh *et al.*, 2002) : des dimères, trimères et tétramères stables en présence de SDS, des oligomères sphériques (Huang *et al.*, 2000) et des oligomères solubles fibrillaires appelés protofibrilles (Walsh *et al.*, 1997 & 1999). Le passage des protofibrilles aux fibrilles implique une élongation, *via* des interactions hydrophobes entre brins β de protofibrilles. Ainsi, la fibrillogénèse d'A β comporte deux étapes : une étape lente de nucléation (oligomérisation) suivie d'une étape rapide de polymérisation (Figure 26). Il a été montré *in vitro* que ces deux étapes sont plus rapides pour A β 42 que pour A β 40. Un mécanisme proposé passe par la formation de paranuclei pentamériques ou hexamériques de A β 42 qui s'associent ensuite entre eux pour former des protofibrilles puis des fibrilles (Bitan *et al.*, 2003).

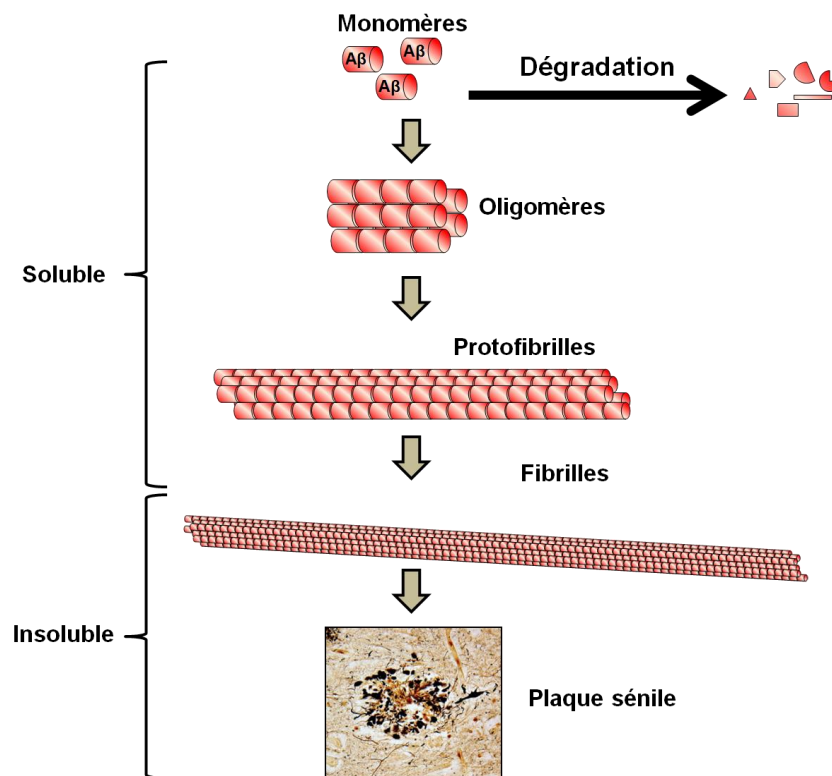


Figure 26 : Processus de fibrillogénèse et formation des plaques séniles (d'après Hampel *et al.*, 2010)

8. Dégradation du peptide A β

L'accumulation du peptide A β dépend de l'équilibre entre sa production et sa dégradation. En plus de sa surproduction éventuelle lors de la MA, plus particulièrement dans les formes familiales, il semblerait que sa dégradation par des peptidases spécifiques soit elle aussi altérée. Les voies habituelles de dégradation des protéines, en réponse notamment à une accumulation anormale, impliquent différents systèmes protéolytiques intracellulaires comme les lysosomes ou le système ubiquitine-protéasome, tandis que la dégradation des protéines extracellulaires en absence d'endocytose implique les protéases. Le peptide amyloïde, qui apparaît subir une accumulation intracellulaire puis extracellulaire, devrait donc activer ces différents systèmes de protéolyse. Différentes enzymes impliquées dans ces processus de dégradation ont été décrits.

- L'IDE (enzyme de dégradation de l'insuline) est une protéase de 120 kDa exprimée de façon ubiquiste. Elle est essentiellement cytosolique ou à l'intérieur des peroxysomes. Il semble qu'elle reconnaisse ses substrats grâce à leur structure secondaire en feuillet β . Son expression baisse fortement au cours du vieillissement et son niveau d'expression est inversement corrélé au nombre de plaques séniles (Caccamo *et al.*, 2005). Son activité est réduite de 20% dans l'hippocampe des personnes MCI et des patients atteints de MA comparativement aux témoins (Zhao *et al.*, 2007).
- La néprilysine (NEP) est une protéine transmembranaire de type II de 97 kDa. Elle possède un court domaine intracellulaire et un large domaine extracellulaire qui porte le site actif. Cette enzyme clive préférentiellement les peptides circulants d'une taille inférieure à 5 kDa. Comme pour l'IDE, l'expression et l'activité de la NEP sont diminuées chez les patients MA (Wang *et al.*, 2010b).
- L'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) est une métalloprotéase de 120 kDa dont le site catalytique est extracellulaire. Les premiers résultats concernant l'hydrolyse d'A β par cette enzyme ont été obtenus dans des expériences de surexpression : le milieu extracellulaire de cellules CHO de hamster chinois transfectées avec un vecteur codant pour l'ECE contient nettement moins d'A β 40 et A β 42 que le milieu extracellulaire de cellules transfectées avec un vecteur vide (Eckman *et al.*, 2001). Ces résultats ont ensuite été confirmés *in vivo* puisque des souris ECE-KO présentent une accumulation d'A β 40 et A β 42 par rapport aux cellules sauvages (Eckman *et al.*, 2003).
- L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) entraîne une réduction de la formation de fibrilles à partir de préparations d'A β synthétique (Hu *et al.*, 2001). Ainsi, Hemming & Selkoe (2005) ont montré que l'expression de l'enzyme ACE favorise la dégradation des A β 40 et A β 42 endogènes. Comme l'IDE et la NEP, l'expression de cette enzyme est diminuée dans le tissu cérébral des MA (Wang *et al.*, 2006b).
- Une nouvelle enzyme dégradant les peptides amyloïdes a été identifiée et nommée peptidasome ou *presequence protease* et abrégée PreP. Présente dans la matrice des mitochondries cérébrales, cette enzyme dégrade les peptides présents dans cet organite, y compris le peptide A β (Falkevall *et al.*, 2006). La clairance de peptides toxiques comme A β peut s'avérer d'importance majeure pour l'homéostasie mitochondriale et jouer un rôle dans la pathologie de la MA. La production élevée d'ERO dans l'organite peut altérer et inhiber PreP, favorisant alors l'accumulation du peptide A β et en conséquence le dysfonctionnement mitochondrial, contribuant ainsi à la MA (Glaser *et al.*, 2010).
- Plusieurs protéines de la grande famille des métalloprotéases de la matrice (MMP) ont été reconnues comme dégradant les peptides A β . Capables de cliver des substrats de grande taille, les MMP peuvent dégrader les peptides A β à l'état fibrillaire (Leissring, 2008). Les MMP sont exprimées dans les neurones ou sécrétées par les cellules gliales (Rosenberg, 2009).
- Outre ces métalloprotéases, la plasmine, une protéase à sérine abondante dans les radeaux lipidiques, dégrade le peptide A β sous forme soluble et fibrillaire (Tucker *et al.*, 2000). Une carence en plasmine a été observée dans l'hippocampe de patients atteints de MA (Ledesma *et al.*, 2000 & 2003).

En conclusion, plusieurs protéases, particulièrement des métalloprotéases, sont capables de couper ou dégrader les peptides A β et ainsi d'en faciliter l'élimination. Mais ces différentes protéases n'agissent ni sur les mêmes formes de peptide A β , ni aux mêmes sites subcellulaires.

9. Causes et facteurs de risques de la MA

L'étiologie complexe de la MA et son origine multifactorielle rendent plus difficile la compréhension des facteurs déclenchant son apparition. La pathogenèse s'appuie sur l'association du déterminisme génétique de l'individu et/ou de combinaisons de facteurs de risque. Différents types de MA sont répertoriés selon leur caractère héréditaire, le déterminisme et l'âge d'apparition de la maladie. On distingue donc dans la MA des formes familiales et des formes sporadiques.

a. Formes familiales de la MA

Dans environ 1% des cas, la MA est liée à un facteur héréditaire et se déclenche précocement, souvent bien avant l'âge de 65 ans (Rocchi *et al.*, 2003), décrivant ainsi une forme familiale de maladie d'Alzheimer (FAD) à transmission autosomique dominante. À ce jour, plus de 150 mutations ont été identifiées sur trois gènes incriminés dans la transmission génétique de la maladie. Les trois gènes susceptibles de porter ces mutations sont : (i) le gène du chromosome 21 codant pour la protéine APP, (ii) deux gènes situés sur les chromosomes 1 et 14, codant respectivement pour les présénilines 2 et 1. C'est ainsi que la plupart des personnes atteintes du syndrome de Down (trisomie 21) expriment 1,5 fois plus d'APP que les individus sains et souffrent de démence de type Alzheimer dès l'âge de 40 ans (Selkoe, 2001).

De manière générale, les mutations associées aux FAD conduisent à une surproduction du peptide amyloïde (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2012), et particulièrement la forme A β 42 (Murayama *et al.*, 1999 ; Cacquevel *et al.*, 2012). Les formes familiales de la MA ne sont donc pas à classer parmi les maladies liées au vieillissement.

b. Formes sporadiques de la MA

Les formes sporadiques de la maladie correspondent effectivement à la MA connue comme une affection neurodégénérative liée à l'âge, apparaissant au-delà de 65 ans. Comme nous le décrirons dans la partie décrivant les facteurs de risque, ces formes à survenue tardive sont cohérentes avec l'idée selon laquelle le vieillissement et les altérations accumulées tout au long de la vie ont affaibli l'individu âgé et affecté ses capacités cognitives. À l'inverse des formes familiales, les formes sporadiques n'induisent généralement pas d'accumulation des peptides amyloïdes, mais l'on considère plutôt que les neurones âgés sont devenus plus sensibles à leur présence. Pouvoir prolonger l'état réactif, fonctionnel et « jeune » des neurones semble donc une stratégie préventive intéressante dans l'espoir de conserver une plasticité synaptique optimale.

Même si les formes sporadiques de MA ne sont pas directement déterminées par les gènes, des facteurs de prédisposition génétique ont été identifiés, parmi lesquels le plus important pour la forme sporadique de la MA est le gène de l'apolipoprotéine E (ApoE). Ce gène, localisé sur le chromosome 19, possède trois allèles majeurs dans la population générale appelés $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$. Ces 3 allèles codent respectivement les isoformes protéiques ApoE2, ApoE3 et ApoE4. Les sujets hétérozygotes pour l'allèle $\epsilon 4$ ont un risque de MA multiplié par 3 à 4, et les sujets homozygotes par 10 à 12, tandis que les porteurs de l'allèle $\epsilon 2$ ont un risque plus faible comparé à l'ensemble de la population (Strittmatter *et al.*, 1993 ; Farrer *et al.*, 1997). ApoE est une protéine jouant un rôle important dans le transport et la distribution des lipides. Au niveau du SNC, il peut jouer également un rôle dans la croissance neuritique, le maintien de l'intégrité neuronale et la stabilisation du cytosquelette associée à l'établissement des synapses cholinergiques (Masliah *et al.*, 1995). Les sujets porteurs de l'isoforme ApoE4 présentent une capacité moindre de remodelage et de plasticité synaptiques (Arendt *et al.*, 1997), une progression plus rapide de la maladie, une perte neuronale accrue, et une diminution du nombre de terminaisons présynaptiques et de l'activité cholinergique (Eggers *et al.*, 2006). Les mécanismes par lesquels la protéine ApoE4 prédispose les sujets à la MA sont loin d'être élucidés. Elle pourrait augmenter l'agrégation d'A β en stimulant le processus d'amyloïdogenèse et ainsi diminuer sa clairance (Mattson, 2004 ; Castellano *et al.*, 2011). Cette protéine pourrait intervenir également dans le processus pathologique de la MA en entraînant un dysfonctionnement du métabolisme ou du trafic des lipides au niveau cérébral. Ainsi, une alimentation riche en cholestérol et en acides gras saturés augmenteraient le risque de développer la maladie. Une hypercholestérolémie augmente le nombre de plaques amyloïdes dans le cortex cérébral de souris transgéniques, le cholestérol s'accumulant à l'intérieur des plaques séniles (Mori *et al.*, 2001). À l'inverse, l'administration d'un hypocholestérolémiant induit une diminution du nombre de plaques amyloïdes (Refolo *et al.*, 2001).

c. Facteurs de risques

i. Les facteurs de risque non modifiables

• L'âge

Comme nous l'avons mentionné précédemment, 99% des patients souffrent de formes sporadiques de la maladie, ces formes sont effectivement liées au vieillissement. Il est donc très logique de constater que l'âge est le principal facteur de risque de la MA. L'incidence de cette maladie est extrêmement faible avant 65 ans (Ferri *et al.*, 2005) et malgré la présence de facteurs génétiques de susceptibilité identifiés, la maladie ne s'exprime cliniquement qu'à partir d'un âge relativement avancé dans la plupart des cas. Le vieillissement normal a été démontré comme causant un déficit synaptique qui affecte particulièrement l'hippocampe (Lister & Barnes, 2009). L'âge influence également le comportement alimentaire. Une réduction physiologique de l'appétit et de la prise alimentaire est observée pendant le vieillissement, conduisant parfois à une anorexie pathologique et une sous-nutrition. La diminution de la

prise alimentaire liée à l'âge pourrait être due à une diminution de la sensation de faim liée à la baisse des besoins énergétiques au repos, ou à la mise en œuvre plus rapide des signaux de la satiété associés à la réduction de la relaxation du fundus de l'estomac (Morley, 1997 ; Chapman *et al.*, 2002).

- **Le genre**

Les femmes ont une espérance de vie plus longue que les hommes, mais tenant compte de cette différence, elles sont plus touchées par la MA puisqu'au-delà de 75 ans, les proportions sont de 13,2% pour les hommes et de 20,5% pour les femmes (Andersen *et al.*, 1999). Différents facteurs ont été évoqués pour expliquer cette observation, même si aucun ne semble plus clairement impliqué que d'autres : la diminution des taux d'œstrogènes à la ménopause, ainsi qu'une dérégulation des systèmes de transport des métaux plus importante chez les femmes, pourraient favoriser le développement de la maladie (Henderson, 1997). Une autre explication avancée s'appuie sur le fait que les hommes et les femmes n'adoptent pas le même comportement alimentaire. Le genre est en effet l'un des déterminants individuels du choix alimentaire, y compris chez les sujets âgés (Payette & Shatenstein, 2005) et différentes études ont caractérisé des profils de consommation alimentaires distincts entre les hommes et les femmes (Bamia *et al.*, 2005 ; Robinson *et al.*, 2009 ; Denison *et al.*, 2012). L'étude des Trois Cités (Montpellier, Bordeaux et Dijon) a précisé ces particularités en montrant que les femmes âgées de 65 ans et plus consomment plus régulièrement des fruits et légumes que les hommes, tout en buvant moins souvent de boissons alcoolisées (Larrieu *et al.*, 2004). La logique voudrait donc que l'on puisse en conclure que les femmes adoptent généralement un régime alimentaire plus conforme aux recommandations attendues pour éviter un vieillissement pathologique, ce qui ne peut donc réellement expliquer leurs taux défavorables de prévalence de la MA.

- ii. Les facteurs de risque modifiables

De nombreux arguments montrent que les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la MA s'activent bien avant l'apparition des symptômes cliniques. Dans ce contexte, il serait intéressant de développer des stratégies permettant d'empêcher l'apparition de la maladie ou au moins de la retarder en s'appuyant sur les facteurs de risque modifiables pour définir des mesures d'intervention préventives.

- **Facteurs liés à la nutrition**

Les interactions entre facteurs nutritionnels et le risque d'apparition de démence apparaissent comme relativement complexes, balayant un champ large de la nutrition et de la physiopathologie des démences. Le diabète, l'insulinorésistance, les vitamines, le cholestérol, les AGPI *n-3* et les antioxydants semblent bien impliqués dans la physiopathologie des démences, appuyés par de nombreuses études *in vitro*, *in vivo* ou épidémiologiques.

Nous avons déjà indiqué que le tissu cérébral est particulièrement vulnérable aux attaques radicalaires du fait de sa faible teneur en antioxydants (Slivka *et al.*, 1987 ; Reiter, 1995 ; Floyd & Hensley, 2002). Les résultats des études longitudinales semblent montrer une relation inverse entre la quantité de vitamines antioxydantes (vitamine E et C) consommées et l'apparition de troubles cognitifs (Fotuhi *et al.*, 2008). Le déclin des fonctions cognitives peut entraîner des changements dans les comportements alimentaires et, de ce fait, être à l'origine de carences ou de déséquilibres nutritionnels considérés comme des facteurs aggravants. La deuxième piste est celle des facteurs métaboliques comme les AG ou le cholestérol. Ainsi, Takechi *et al.* (2010a & 2010b) ont montré que la consommation chronique d'acides gras saturés (AGS) ou de cholestérol chez la souris affecte l'intégrité de la vasculature cérébrale en induisant un dysfonctionnement de la barrière hématoencéphalique (BHE). Ceci favorise l'apport au cerveau de protéines plasmatiques dont les apolipoprotéines B qui sont enrichies en peptide A β . Par ailleurs, les AGS, notamment ceux à très longue chaîne, semblent capables d'induire des altérations morphologiques et fonctionnelles des mitochondries dans les cellules de neuroblastome humain SK-NB-E (Zarrouk *et al.*, 2012). À l'inverse, un apport en acides gras polyinsaturés (AGPI), particulièrement les *n*-3, est associé à une diminution du risque de démence dans plusieurs études comme la *Rotterdam Study* (Kalmijn *et al.*, 1997 ; Lopez *et al.*, 2011). En plus de leur rôle dans la composition et la fluidité membranaire de neurone, les AGPI ont un effet sur les phénomènes neuro-inflammatoires et sur les propriétés vasculaires cérébrales. Il est important de noter, malgré la complexité de l'analyse épidémiologique des relations entre consommation de nutriments et déclin cognitif, qu'il est très peu probable qu'un composé isolé puisse conférer une protection contre la démence. Les résultats issus de l'étude française des Trois Cités suggèrent qu'une alimentation peu diversifiée augmente le risque de démence (Barberger-Gateau *et al.*, 2007). Ainsi, l'intérêt du régime méditerranéen a été largement évalué et de nombreuses études ont montré une diminution du risque et de la mortalité cardiovasculaires grâce à une alimentation favorisant des apports élevés en légumes, fruits, céréales et AG insaturés, modérément élevés en poisson, des apports modérés en produits laitiers, faibles en viandes et volailles et associée à une consommation modérée de vin. Des études longitudinales plus récentes montrent aussi une diminution de l'incidence du déclin cognitif, du MCI et de la MA chez les populations ayant ce type d'alimentation (Scarmeas *et al.*, 2006 ; Féart *et al.*, 2011).

- **Dyslipidémies**

Des études suggèrent que la physiopathologie de la MA est liée au métabolisme du cholestérol. En effet, celui-ci altère le métabolisme de la protéine APP et induit une accumulation de peptide A β (Burns & Duff, 2002). Davantage de cholestérol a été détecté dans le cerveau des patients atteints de MA, en particulier autour des plaques séniles et au niveau des neurites dystrophiques. Cette accumulation induit une surproduction du peptide A β par une activité accrue des β - et γ - sécrétases (Xiong *et al.*, 2008). Chez des souris transgéniques modèles de MA sous un régime riche en cholestérol, le taux de peptide A β total est fortement corrélé aux taux de cholestérol total plasmatique et cérébral (Refolo *et al.*,

2000). De plus, la dyslipidémie, caractérisée par une élévation des taux circulants de triglycérides et/ou de cholestérol, est associée aux pathologies cérébrovasculaires considérées comme des facteurs de risque potentiels de la MA. Enfin, le métabolisme du cholestérol est lié au gène de l'apoE, l'allèle ε4 étant le principal facteur de susceptibilité génétique des formes sporadiques. Les données épidémiologiques concernant les relations entre la MA et les dyslipidémies restent cependant contradictoires. Si l'hypercholestérolémie est un facteur de risque établi des accidents vasculaires cérébraux et des troubles cognitifs d'origine vasculaire, ses liens avec la MA sont plus complexes (Panza *et al.*, 2006). Les résultats des études longitudinales majeures divergent également. D'une manière générale, lorsque le suivi est très long, une association avec la MA est retrouvée (Kivipelto *et al.*, 2001 ; Solomon *et al.*, 2009), mais pas quand le suivi est plus court (Tan *et al.*, 2003 ; Reitz *et al.*, 2004). Le traitement *in vitro* par des statines, inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol, réduit fortement les taux d'Aβ40 et Aβ42 intracellulaires et sécrétés (Fassbender *et al.*, 2001). Chez l'homme, des études épidémiologiques ont montré une diminution d'environ 70% de la prévalence de la MA chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires traités par des statines (Jick *et al.*, 2000 ; Wolozin *et al.*, 2000).

- **Obésité**

L'obésité est fortement associée à la pathologie Alzheimer. L'adiposité, définie comme la quantité corporelle de tissu adipeux, est un continuum pour lequel il n'existe pas de seuil pertinent cliniquement établi (Luchsinger & Gustafson, 2009). Diverses mesures de l'adiposité sont utilisées dans les études épidémiologiques, incluant l'indice de masse corporelle ou IMC, qui correspond à la masse corporelle (en kg) rapportée à la taille (en m) élevée au carré. L'IMC n'est pas une mesure parfaite du taux d'adiposité, car influencé aussi par l'origine ethnique et l'âge. Le ratio tour de taille / tour de hanche, ou le tour de taille seul, sont des mesures de la distribution de la masse grasse, respectivement viscérale et sous-cutanée (Gustafson, 2006). Un IMC élevé en milieu de vie a été associé à un risque augmenté de démence en fin de vie (Kivipelto *et al.*, 2005 ; Whitmer *et al.*, 2005). Par contre, l'impact de l'IMC en fin de vie reste controversé. Une seule étude longitudinale menée sur 18 ans chez 392 femmes suédoises de 70 à 85 ans, a montré que le risque de MA augmente de 36% pour 1 kg/m² supplémentaire d'IMC à partir de 70 ans (Gustafson *et al.*, 2003). Davantage d'études, dont l'étude PAQUID, ont rapporté au contraire un risque accru de démence chez les sujets à faible IMC (Nourhashémi *et al.*, 2003; Luchsinger *et al.*, 2007a ; Atti *et al.*, 2008) ou chez ceux ayant subi une perte de poids importante précédant le diagnostic (Buchman *et al.*, 2005 ; Johnson *et al.*, 2006). Ces résultats contradictoires en fonction de la période de mesure de l'adiposité pourraient être liés à la nature de la MA, dont le processus physiopathologique est susceptible de débuter plusieurs dizaines d'années avant l'apparition des symptômes. Ainsi, un taux d'adiposité élevé en milieu de vie, observé à une période qui précède le processus neuropathologique de la démence, pourrait précipiter l'apparition des troubles cognitifs par médiation vasculaire ou par les effets délétères de composés bioactifs sécrétés par le tissu adipeux comme la leptine ou les adipocytokines (Gustafson, 2006).

- **Diabète**

Certains auteurs considèrent la MA comme une pathologie neuroendocrinienne parfois même appelée diabète de type 3 (Kroner, 2009). La majorité des études épidémiologiques longitudinales montre une association délétère entre diabète, troubles cognitifs et démence, de type vasculaire comme de type Alzheimer (Biessels *et al.*, 2006). En effet, une association entre diabète et troubles mnésiques a été retrouvée chez des sujets âgés (Luchsinger *et al.*, 2007b). L'étude de Rotterdam a aussi montré une association positive entre l'existence d'un diabète et la survenue d'une démence avec un risque relatif de MA de 1,9 (Ott *et al.*, 1999). Les mécanismes mis en jeu dans l'association délétère entre diabète et risque de démence impliquent probablement les micro- et macro-angiopathies associées au diabète. L'hyperinsulinémie engendrée par l'insulinorésistance dans le diabète de type 2 pourrait aussi être en cause, puisqu'elle a été associée à une augmentation du risque de MA, y compris chez les non diabétiques (Luchsinger *et al.*, 2004). Des effets directs de l'insuline sont également probables dans le cerveau, très riche en récepteurs spécifiques et surtout dans l'hippocampe et le cortex. L'insuline franchit la BHE et module notamment l'homéostasie énergétique et la prise alimentaire, ainsi que l'apprentissage et la mémoire (Zhao & Alkon, 2001). De plus, une modification des récepteurs de l'insuline a été observée dans le cerveau de patients MA autopsiés par rapport à des sujets contrôles de même âge (Frölich *et al.*, 1998). Enfin, l'altération de l'homéostasie de l'insuline serait impliquée dans le métabolisme de la protéine amyloïde. L'insulinorésistance est associée à une hyperinsulinémie périphérique et à une diminution du transport de l'insuline à travers la BHE, induisant une diminution de la concentration intracérébrale de l'insuline qui a été associée à une augmentation de la production d'A β et de la phosphorylation de Tau chez les souris. Chez l'homme, l'administration intraveineuse d'insuline a été associée à une augmentation des niveaux d'A β 42 dans le LCR. Enfin, l'insuline pourrait inhiber la clairance extracellulaire des plaques amyloïdes par compétition avec l'enzyme IDE de dégradation de l'insuline, sachant qu'une diminution de l'expression de cette enzyme a été notée dans l'hippocampe de sujets MA, en particulier chez les sujets exprimant l'isoforme ApoE4 (Cook *et al.*, 2003). De façon intéressante, la consommation élevée de fruits, légumes et produits laitiers allégés en matières grasses a été associée à une diminution de l'incidence du diabète de type II (Liese *et al.*, 2009). D'autres études ont suggéré une relation entre certains profils de consommation alimentaire et le risque de diabète (McNaughton *et al.*, 2008). Le diabète, engendré par un déséquilibre nutritionnel et facteur de risque de démence, pourrait donc lui aussi être un facteur médiateur à considérer dans la relation entre nutrition et vieillissement cérébral.

- **Hypertension artérielle**

Les relations entre l'efficacité cognitive et les valeurs de pression artérielle ont fait l'objet de nombreux travaux. Une étude menée chez 700 sujets âgés présentant déjà une MA indique une aggravation plus importante des troubles cognitifs chez les hypertendus que chez les normotendus (Elias *et al.*, 1993). Les études longitudinales sont les plus informatives puisqu'elles étudient la conséquence

de l'hypertension artérielle (HTA) chronique sur les fonctions cognitives. Leurs résultats sont concordants et la plupart d'entre elles indiquent un lien entre l'HTA et l'altération cognitive. En particulier, l'HTA à l'âge moyen de la vie est un paramètre fortement prédictif d'une détérioration cognitive ultérieure. Ainsi, plus la pression artérielle initiale est élevée, moins bon est le fonctionnement cognitif ultérieur. C'est ce qu'une étude de cohorte a montré, avec une augmentation significative du déclin cognitif chez les hypertendus après 25 ans de suivi (Launer *et al.*, 1995). Des données similaires ont été rapportées sur la cohorte d'Uppsala (Kilander *et al.*, 1998), les fonctions cognitives évaluées à l'âge de 70 ans étant moins bonnes chez les patients dont les pressions artérielles sont élevées à l'âge de 50 ans. En France, l'étude EVA du vieillissement artériel a montré un risque de déclin cognitif augmenté par 2,8 chez des hypertendus âgés au terme d'un suivi de seulement 4 ans (Tzourio *et al.*, 1999). Une étude plus récente portant sur une analyse de 10.963 sujets de la cohorte ARIC a retrouvé la même corrélation entre la présence d'une HTA et la survenue d'une altération cognitive 6 ans plus tard (Knopman *et al.*, 2001). L'HTA expose non seulement au risque de déclin cognitif, mais aussi au risque de démence. Une relation existe entre la pression artérielle mesurée à l'âge de 70 ans et l'incidence de la démence (vasculaire ou Alzheimer) 9 à 15 ans plus tard (Skoog *et al.*, 1996). Ainsi, les valeurs de pression artérielle à l'âge de 70 ans sont plus élevées chez les patients qui développeront une démence entre 79 et 85 ans, en comparaison à ceux qui n'en développeront pas. Plusieurs autres travaux ont démontré une augmentation du risque de démence chez les hypertendus et des essais thérapeutiques ont permis de conclure à un effet bénéfique du traitement antihypertenseur sur la prévention du déclin cognitif ou des démences. L'étude Progress (Tzourio *et al.*, 2003) a mesuré une réduction significative de 19% du déclin cognitif sévère grâce à un traitement antihypertenseur chez des patients avec un antécédent d'accident vasculaire cérébral. De même, une étude plus récente sur 1.241 sujets âgés hypertendus a montré que le traitement antihypertenseur est associé à un risque plus faible de MA. (Hanon *et al.*, 2006).

- **Facteurs démographiques**

Il s'agit là de ce qui s'appelle parfois les « habitudes de vie ». La plupart des études indiquent qu'un niveau d'éducation élevé paraît un facteur protecteur, tout comme certaines activités sociales et de loisirs. Ainsi, les activités qui nécessitent la planification des tâches et l'initiative (cuisiner, jardiner, voyager, bricoler, tricoter) paraissent associées à un risque moindre de démence (Stern *et al.*, 1994 ; Akbaraly *et al.*, 2009 ; Meng & D'Arcy, 2012). L'activité physique permettrait également de réduire les risques de développer la MA (Buchman *et al.*, 2012). À l'inverse, un faible réseau social semble augmenter le risque de démence de 60% (Fratiglioni *et al.*, 2000). Par ailleurs, la consommation de tabac est associée à une augmentation du risque de MA (Cataldo *et al.*, 2010), tout comme l'abus d'alcool et la dépendance alcoolique qui favorisent généralement une survenue de démence précoce (McMurtray *et al.*, 2006). À l'inverse, une consommation modérée de vin pourrait avoir un effet protecteur à 18% pour toute démence incidente (Lemeshow *et al.*, 1998).

En résumé, une hygiène de vie alliant une bonne santé cardiovasculaire (alimentation équilibrée, faible consommation d'alcool ou de tabac, activités physiques...) et un bien-être social pourraient composer l'association idéale pour prévenir la MA (Akbaraly *et al.*, 2009).

10. Modèles animaux de la MA

a. Les modèles animaux transgéniques

Le développement de souris transgéniques modèles de la MA a été un domaine de recherche assez foisonnant visant à reproduire *in vivo* chez l'animal des lésions de type Alzheimer associées à des troubles cognitifs, et ainsi de mieux comprendre le rôle des différentes lésions neuropathologiques dans l'étiologie de la maladie. Du fait de la complexité de la MA, il existe donc aujourd'hui de multiples souris modèles permettant de répondre à des questions précises et variées. Des souris transgéniques ont même cumulé plusieurs modifications géniques afin de complexifier le modèle et tenter de le rendre plus proche de l'homme, visant notamment à produire des taux élevés de peptide A β et à induire un développement précoce de la démence. Ainsi, Oddo *et al.* (2003) ont généré des souris triple-transgéniques qui combinent l'expression de trois protéines mutantes, APP, PS1 et Tau. Ces souris développent des plaques amyloïdes dans le cortex dès l'âge de 3 mois et atteignant l'hippocampe à l'âge de 6 mois. Les DNF apparaissent plus tardivement dans l'hippocampe, à l'âge de 12 mois, puis dans le cortex vers l'âge de 18 mois. Ce modèle présente aussi une perte synaptique, une perturbation du mécanisme de la LTP et une augmentation dans la réactivité astrocytaire. Si les symptômes et les altérations observés chez ces souris semblent en effet globalement comparables à ceux que développent les patients atteints de la MA, il est évident que les mutations et modifications géniques utilisées pour concevoir l'animal modèle sont très éloignées des causes étiologiques de la maladie humaine, *a fortiori* de la MA sporadique dans laquelle les altérations dues au vieillissement jouent un rôle déterminant. L'on peut également s'interroger sur l'importance accordée aux plaques amyloïdes, qui ont pourtant été montrées comme des marqueurs anatomopathologiques peu spécifiques et sensibles, ou à la production élevée de peptides A β qui ne correspond vraisemblablement pas à la réalité de la situation dans la MA sporadique, soit 99% des cas. Or, la question des modèles animaux est évidemment cruciale, dans la mesure où le développement préclinique de nouvelles molécules et stratégies thérapeutiques doit permettre un criblage efficace conduisant la R&D aux études cliniques avec le maximum de chances de réussir à faire émerger un traitement efficace, attendu et espéré par des millions de malades. Mais vu le nombre d'études cliniques qui, ces dernières années, ont dû être arrêtées ou n'ont pas donné de résultats favorables après la phase II ou III, force est d'en déduire que les modèles animaux de MA qui ont été développés, quelle que soit leur sophistication, n'ont pas encore réussi à simuler la maladie humaine dans toute sa complexité. La « course » aux modèles se poursuit donc, dans laquelle on peut éventuellement regretter que les modifications géniques s'additionnent sans considérer les aspects étiologiques connus de tous et listés précédemment.

b. Les modèles d'injection intracérébrale du peptide A β

Comme nous l'avons mentionné, les modèles animaux transgéniques reposant sur la surproduction et l'accumulation de peptides A β sont assez peu conformes à la réalité physiopathologique de la MA sporadique, et en particulier des stades précoces. Ceci a conduit à la nécessité de concevoir de nouvelles approches précliniques s'appuyant sur de nouveaux modèles, plus simples sinon plus pertinents, et capables de répondre aux attentes des acteurs de la recherche sur la MA et des désordres métaboliques associés. Plusieurs groupes, dont notre laboratoire, ont développé un modèle animal dans lequel le déclin cognitif est accéléré par injection intracérébroventriculaire (ICV) du peptide A β neurotoxique dans les ventricules latéraux. Cette injection permet au peptide A β d'atteindre plus facilement le système limbique dans lequel se trouve l'hippocampe. L'un des avantages apportés par ce type de modèle est de reproduire rapidement différentes altérations cellulaires et moléculaires induites par le peptide A β et de les corrélérer avec les performances cognitives des animaux. De plus, il est possible de simuler des expositions chroniques en administrant les peptides amyloïdes sur des périodes plus longues (jusqu'à 30 jours) grâce à des mini-pompes osmotiques ou par des canules implantées permettant des injections répétées. Les Tableaux 4 et 5 regroupent les principaux modèles d'injection intracérébrale du peptide A β développés chez les rongeurs durant ces deux dernières décennies.

Tableau 4 : Modèles d'injection de peptide A β soluble chez la souris

Souche	Aβ soluble	Site d'injection	Paramètre	Références
C57Bl/6J apoE ^{-/-}	1-40	NC	Transport BHE	Shibata <i>et al.</i> , 2001
ICR	1-42 ; 25-35	ICV	Inflammation périph. Suite injection icv	Song <i>et al.</i> , 2001
ICR	1-40/42	ICV	Clairance A β via BHE	Ji <i>et al.</i> , 2001
SVJ	25-35 (injections répétées)	ICV	Mémoire à court terme et perte cholinergique	Yamada <i>et al.</i> , 2005
C57Bl/6J	1-40/42 ;x-42	ICV	Mémoire et Stress oxydant	Youssef <i>et al.</i> , 2008
C57Bl/6J	1-40/42 ;x-42	ICV	Mémoire	Garcia <i>et al.</i> , 2010

Plusieurs types de peptides sous des états différents ont été injectés en ICV, et particulièrement les oligomères A β solubles (A β Os). Ces formes diffusibles d'A β provoquent des processus rapides de dysfonctionnement synaptique, un stress oxydant et une réponse inflammatoire, associés à une altération des capacités cognitives principalement évaluées par des tests validés d'apprentissage et de mémoire. Flood *et al.* (1991) ont montré que l'injection ICV d'A β Os entraîne une amnésie à court terme, mise en évidence par le test d'évitement passif. La même année, Kowall *et al.* (1991) observent une mort neuronale dans la région CA₁ de l'hippocampe 7 jours après injection dans le cortex. L'injection ICV de concentrations subnanomolaires de formes oligomériques de peptide A β induit une réduction de la LTP dans cette même région CA₁ dès 24 h après l'injection (Walsh *et al.*, 2002). Ainsi, une altération des capacités d'apprentissage et la mémoire à court et à long terme a été remarquée chez les souris injectées

ICV d'AβOs (Yan *et al.*, 2001). Ces résultats ont été confortés et explicités de manière significative par les travaux menés par notre équipe (Youssef *et al.*, 2008 ; Garcia *et al.*, 2010), utilisant les oligomères précédemment caractérisés *in vitro* (Kriem *et al.*, 2005 ; Fifre *et al.*, 2006 ; Malaplate-Armand *et al.*, 2006 ; Florent *et al.*, 2006).

Tableau 5 : Modèles d'injection de peptide Aβ soluble chez le rat

Souche	Aβ soluble	Site d'injection	Paramètre	Références
Sprague-Dawley	1-40	Cortex	Mort neuronale dans le CA1 de l'hippocampe	Kowall <i>et al.</i> , 1991
Sprague-Dawley	1-40	Hippocampe	Déficit de mémoire à court terme	Sweeney <i>et al.</i> , 1997
Sprague-Dawley	1-40 ; répétée	Hippocampe	Déficit de mémoire à court terme	Cleary <i>et al.</i> , 1995
Sprague-Dawley	1-40	Hippocampe	Déficit de mémoire à long terme	Mc Donald <i>et al.</i> , 1996
Wistar Sprague-Dawley	1-40/43	Hippocampe	Neurotoxicité, LTP, mémoire et apprentissage	Stephan <i>et al.</i> , 2001
Sprague-Dawley	Oligomères naturels 1-40/42	ICV	LTP	Walsh <i>et al.</i> , 2002

C. Vers une approche nutritionnelle préventive du vieillissement pathologique

- Des perturbations du métabolisme et de la signalisation lipidiques sont certainement impliquées dans les phases précoces de la pathogenèse de la MA.
- Les lipides alimentaires comme les AGPI *n*-3 apparaissent comme des composés capables d'impacter directement non seulement le métabolisme lipidique, mais aussi les fonctions cognitives et les capacités de lutte contre le vieillissement cérébral normal et pathologique.
- Les polyphénols pourraient eux aussi exercer leur potentiel neuroprotecteur et peut-être créer des synergies d'action pouvant renforcer les effets bénéfiques des AGPI *n*-3.

1. Le cholestérol, un facteur de risque

a. Synthèse et métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui joue un rôle important dans la structure et la fonction des membranes, en particulier celles de la membrane plasmique. Il est nécessaire pour la croissance et la viabilité cellulaire. Sa structure, très hydrophobe, consiste en quatre cycles carbonés notés de A à D avec un groupe hydroxyle sur le carbone 3 (Figure 27). Cette fonction est importante car elle peut réagir avec les acides gras pour donner des esters de cholestérol. Une dérégulation de l'homéostasie du cholestérol est un facteur de risque majeur dans de nombreuses maladies dont la MA.

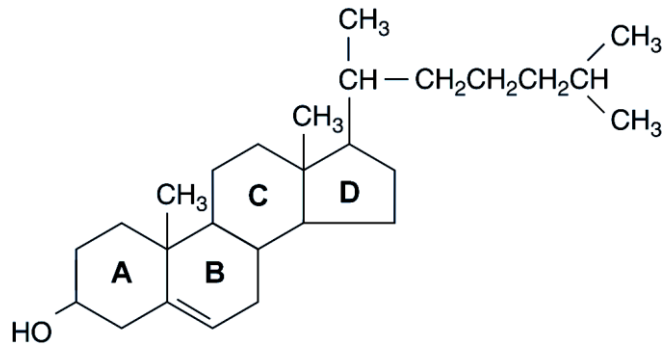


Figure 27 : Représentation du cholestérol en structure plane

i. Synthèse

Le cerveau représente environ 3% du poids corporel chez l'homme, mais il comprend 25% du cholestérol total. Il est principalement retrouvé sous forme estérifiée dans la myéline (70 à 80%). Les organes assurent leurs besoins en cholestérol par deux mécanismes : la synthèse *de novo* et la capture du cholestérol circulant. Or, des études montrent le cerveau se distingue par le fait que son cholestérol ne provient pas de celui du plasma par les HDL ou LDL à travers la BHE, et que la quasi totalité de ses besoins sont couverts par une synthèse *de novo* (Quan *et al.*, 2003 ; Björkhem, 2006). Cette synthèse diminue au cours de la vie adulte, mais la demi-vie du cholestérol dans le cerveau adulte est très longue et a été estimée à 5 ans chez l'homme (Martins *et al.*, 2009). Dans le SNC adulte, le cholestérol est synthétisé très majoritairement par les astrocytes et les cellules gliales, dans une moindre mesure par les oligodendrocytes et faiblement par les neurones. Étant donné son rôle crucial dans le fonctionnement du SNC, la synthèse, le métabolisme et l'excrétion du cholestérol sont tous strictement contrôlés (Schreurs, 2010). Il est synthétisé à partir de l'acétyl-CoA par la voie des mévalonates (Figure 28). L'étape limitante et finement régulée est la conversion de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) en mévalonate par la HMG-CoA réductase (HMGCR). Cette enzyme et les suivantes fonctionnent dans la membrane du réticulum endoplasmique de la cellule. Le métabolisme du cholestérol dans le SNC est similaire à celui du reste de l'organisme.

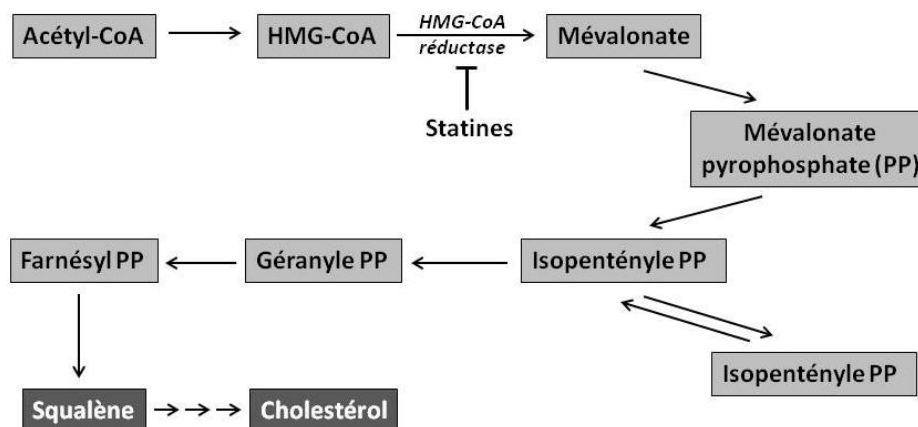


Figure 28 : Voie de synthèse du cholestérol (d'après Tobert, 2003)

ii. Transport, stockage et élimination

Dans les neurones, le cholestérol est incorporé et redistribué au sein des membranes lors des remodelages synaptiques sous forme libre ou estérifiée, lié aux lipoprotéines. L'ApoE est l'apolipoprotéine majoritaire dans le cerveau, synthétisée majoritairement par les cellules gliales, en particulier par les astrocytes qui libèrent dans le milieu des particules ApoE-cholestérol-phospholipides sphériques ou discoïdales complexes, comparables en taille aux HDL et internalisables par les neurones. Ces particules sont assemblées dans le LCR avant d'atteindre les neurones où elles se lient à des récepteurs membranaires de la famille des LRP (*LDL receptor-related proteins*) pour subir l'endocytose. L'endosome résultant du complexe ApoE-cholestérol-phospholipides fusionne avec les lysosomes dont les enzymes hydrolytiques libèrent le cholestérol dans la cellule. Ce dernier est alors stocké après estérification par une acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT), ou dirigé vers les membranes. Le cholestérol libre assure un rétrocontrôle négatif sur l'activité de la HMGCR pour réduire la synthèse endogène du cholestérol. Par contre, l'estérification par l'ACAT induit un stockage plus efficace. Ce pool intracellulaire de cholestérol sert de ressource pour la formation et le remodelage des membranes au niveau synaptique et dendritique (Shobab *et al.*, 2005). La synthèse en excès de cholestérol dans le cerveau entraîne une augmentation de son efflux vers le plasma à travers la BHE, ce qui n'est possible qu'après conversion en 24-hydroxycholestérol par la cholestérol 24-hydroxylase ou CYP46 (Björkhem *et al.*, 1997). L'ensemble de ces étapes est illustré par la Figure 29.

b. Localisation et trafic du cholestérol cellulaire

Le cholestérol représente 20 à 25% des molécules lipidiques de la membrane plasmique où se trouverait 80 à 90% du cholestérol cellulaire total. Il est abondant aussi dans les endosomes et l'appareil de Golgi, particulièrement le trans-Golgi. À l'inverse, le réticulum endoplasmique et les membranes mitochondriales internes en contiennent de très faibles quantités (Mukherjee *et al.*, 1998). Le cholestérol affecte plusieurs processus cellulaires en interagissant avec d'autres lipides membranaires et des protéines spécifiques. Sa structure lui confère des propriétés biophysiques particulières comme celle d'augmenter le regroupement et la cohésion des lipides avoisinants, ce qui entraîne une diminution de la fluidité et de la perméabilité membranaire. Cette organisation latérale orchestre la spécialisation de la membrane plasmique. Même s'il n'y a pas de consensus quant à la taille, la dynamique, ou les forces qui gouvernent ces régions, la composition des radeaux lipidiques postule une association préférentielle du cholestérol avec les sphingolipides pour former des plateformes stabilisées par des protéines (Simons & Ikonen, 1997). Contenant 30 à 50% de cholestérol, soit 3 à 5 fois plus que les autres régions membranaires, ces microdomaines très structurés serviraient notamment pour la transduction du signal, le trafic membranaire, et l'adhésion cellulaire (Balasubramanian *et al.*, 2007 ; Viola & Gupta, 2007). Les protéines des radeaux ou rafts peuvent être théoriquement caractérisées biochimiquement en isolant les domaines résistants aux détergents. *In vivo*, la taille d'un radeau est trop petite (inférieure à 100 nm) pour pouvoir être détectée par la microscopie optique.

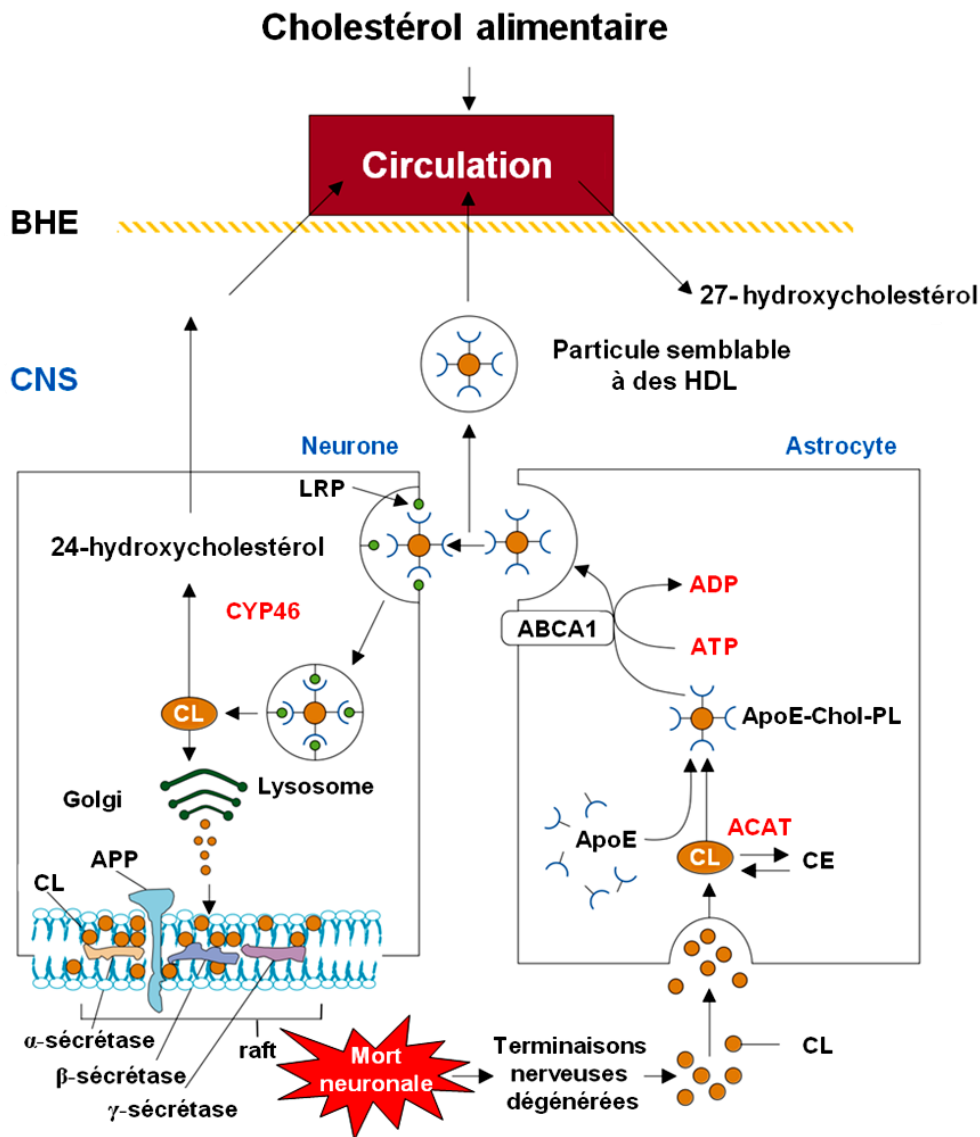


Figure 29 : Métabolisme, transport et internalisation du cholestérol dans le SNC (d'après Shobab *et al.*, 2005)

c. Cholestérol cérébral et susceptibilité à la MA

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'ApoE est le transporteur privilégié du cholestérol dans le cerveau, mais aussi l'un des principaux facteurs de risque de la forme sporadique de la MA. De nombreuses études ont donc tenté de corréler les taux de cholestérol plasmatique ou cérébral avec la pathologie. Ces données sont nombreuses et encore débattues, mais un consensus semble se dégager autour d'une augmentation de la production du peptide A β liée à une surcharge en cholestérol.

d. Taux de cholestérol chez les patients atteints de la MA

i. Dans le plasma sanguin

De nombreuses études ont rapporté un lien significatif entre un taux de cholestérol plasmatique élevé et une plus grande susceptibilité de développer la MA (Kivipelto *et al.*, 2002 ; Solomon *et al.*,

2009 ; Reiman *et al.*, 2010), mais quelques études cependant n'ont pas pu démontrer ce lien (Reitz *et al.*, 2004 ; Mielke *et al.*, 2005). Des études ont réussi à trouver une diminution de la concentration de HDL dans le sang des patients atteints de la MA (Merched *et al.*, 2000). Néanmoins, aucun profil lipidique plasmatique particulier n'est pour l'instant clairement associé à la MA, les résultats contradictoires étant certainement le fait de la multitude de facteurs qui peuvent influencer sur les paramètres lipidiques sanguins comme le phénotype de l'ApoE, le stade de la maladie, l'âge ou les aspects nutritionnels.

ii. Dans le cerveau

Peu d'études se sont intéressées aux concentrations de cholestérol dans le SNC au cours de la MA. Néanmoins, les deux dernières études sérieuses ont mesuré une augmentation du cholestérol dans le cerveau des patients. La première (Cutler *et al.*, 2004) montre que chez les malades, le cholestérol est augmenté dans le gyrus frontal, mais pas dans le cervelet. Les auteurs ont isolé les membranes des cerveaux de patients décédés à différents stades de la maladie et constaté que le taux de cholestérol membranaire augmente significativement au cours de la maladie, étant supérieur à celui des sujets témoins dès le stade modéré et continuant à s'élever au fur et à mesure que la maladie progresse. La seconde étude (Xiong *et al.*, 2008) a détecté davantage de cholestérol dans le cerveau des patients Alzheimer par des méthodes enzymatiques, chimiques et immunohistologiques. Le cholestérol serait présent autour des plaques séniles et au niveau des neurites dystrophiques. Les auteurs proposent que l'accumulation du cholestérol soit responsable de l'augmentation de la production du peptide amyloïde par une activité accrue des β - et γ - sécrétases.

e. **Modulation des taux de cholestérol : impact sur la MA**

i. Méthyl- β -cyclodextrine

La méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) est une molécule utilisée pour diminuer le cholestérol de la membrane plasmatique. Or, un traitement de neurones primaires en cultures par la M β CD diminue la production *in vitro* du peptide A β (Guardia-Laguarta *et al.*, 2009) et empêche la mort neuronale provoquée par ce peptide (Abramov *et al.*, 2011). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette diminution, comme l'augmentation de l'activité α -sécrétase ou la perturbation des radeaux lipidiques conduisant à la baisse du clivage amyloïdogène de l'APP (Ehehalt *et al.*, 2003). Une seule étude mesure une augmentation de la production du peptide amyloïde en déplaçant le cholestérol membranaire (Abad-Rodriguez *et al.*, 2004). Enfin, la déplétion du cholestérol membranaire par la M β CD semble rendre les neurones davantage vulnérables aux effets cytotoxiques du peptide A β sous forme oligomérique soluble, mais pas sous forme fibrillaire (Sponne *et al.*, 2004), ce qui suggère que l'interaction du peptide avec la membrane neuronale puisse effectivement impliquer un ou des éléments sensibles à la structure ou aux propriétés de la bicouche.

ii. Statines

Les statines sont des inhibiteurs pharmacologiques de la HMG-CoA réductase, utilisés comme médicaments pour baisser la cholestérolémie de personnes à risque pour les maladies cardiovasculaires et présentant des taux de cholestérol élevés. Les études *in vitro* sur des lignées neuronales surexprimant la protéine APP montrent que les statines augmentent l'activité α -sécrétase, diminuant donc la sécrétion du peptide A β (Fassbender *et al.*, 2001) et les réponses inflammatoires (Paris *et al.*, 2002) en conséquence d'une diminution du cholestérol dans le feuillet externe de la membrane plasmique (Kirsch *et al.*, 2003). La diminution de la production amyloïde a aussi été démontrée *in vivo* chez des souris transgéniques modèles de MA traitées par des statines (Shinohara *et al.*, 2010) et corrélée à une protection contre la perte de mémoire (Kurinami *et al.*, 2008). À l'inverse, des régimes riches en cholestérol augmentent le nombre de plaques séniles (Shie *et al.*, 2002). Chez l'homme, des études épidémiologiques ont montré une diminution de la prévalence de la MA chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires traités par des statines (Wolozin *et al.*, 2000 ; Rockwood *et al.*, 2002 ; Yaffe *et al.*, 2002 ; Haag *et al.*, 2009), mais ces résultats n'ont pu être confirmés par d'autres (Li *et al.*, 2004, 2007 ; Zandi *et al.*, 2005 ; Arvanitakis *et al.*, 2008).

iii. Acylcoenzyme A cholesterol acyltransférase (ACAT)

Des travaux ont montré qu'il ne semble pas nécessaire de modifier la concentration de cholestérol pour déréguler la production du peptide A β . Une simple redistribution du cholestérol dans la cellule semble suffisante pour altérer le clivage de la protéine APP. ACAT est une enzyme qui génère des esters de cholestérol à partir du cholestérol libre. Une inhibition de cette enzyme améliore les performances cognitives chez les souris transgéniques modèles de MA tout en réduisant la pathologie amyloïde en diminuant le nombre de plaques séniles (Hutter-Paier *et al.*, 2004 ; Huttunen *et al.*, 2010).

iv. Cholestérol 24-hydroxylase

La cholestérol 24-hydroxylase ou CYP46 convertit le cholestérol en 24S-hydroxycholestérol afin d'être exporté dans la circulation sanguine. Une surexpression de cette enzyme diminue la quantité de peptide A β et des plaques séniles et améliore les performances cognitives des souris (Hudry *et al.*, 2010). Le mécanisme mis en jeu est encore mal connu, mais passerait par la diminution de l'activité γ -sécrétase. À l'inverse, l'inhibition de CYP46 augmente la production de peptide A β dans le cerveau. Tous ces résultats peuvent donc suggérer une influence incontestable des taux de cholestérol cérébral.

2. Les acides gras polyinsaturés de la série n-3, des acides gras protecteurs

L'alimentation est un facteur environnemental auquel un individu est exposé tout au long de sa vie. Elle est donc fort logiquement considérée aujourd'hui comme un facteur de risque ou de prévention de diverses pathologies. Certaines classes de micronutriments comme les acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 sont indispensables au fonctionnement de l'organisme et suscitent un intérêt particulier, un apport

alimentaire insuffisant entraînant des dysfonctionnements sévères pouvant mener à l'apparition de maladies. Or, depuis l'apparition de l'agriculture il y a 10.000 ans, puis l'industrialisation depuis le milieu du XIX^e siècle, le ratio des AGPI *n-6/n-3* n'a cessé pas d'augmenter dans le régime occidental.

a. Caractéristiques structurales

Les AG sont des acides carboxyliques aliphatiques composés d'une chaîne linéaire de 4 à 28 carbones portant une extrémité méthyle et une extrémité carboxyle. Les Tableaux 6 et 7 résument la nomenclature classique, chimique et biochimique des principaux acides gras présents dans les composés biologiques. Ces AG diffèrent entre eux par la longueur de la chaîne carbonée et par le type de liaisons entre atomes de carbone. Ils sont qualifiés de saturés lorsqu'ils ne contiennent que des liaisons simples et d'insaturés lorsqu'ils comptent au moins une liaison éthylénique ou double C=C. Les propriétés physicochimiques des AG dépendent de la longueur de leur chaîne carbonée et du nombre de liaisons doubles. Ainsi, plus la chaîne carbonée est longue, plus la solubilité de ces molécules dans l'eau est faible. De même, le degré d'insaturation entraîne une diminution du point de fusion.

Tableau 6 : Principaux acides gras saturés présents dans les molécules biologiques

Nom usuel	Nomenclature chimique (IUPAC)	Nomenclature physiologiques	Formule chimique semi-développée
Acide gras saturés (AGS)			
Ac. butyrique	Ac. butanoïque	C4:0	H ₃ C-(CH ₂) ₂ -COOH
Ac. valérique	Ac. pentanoïque	C5:0	H ₃ C-(CH ₂) ₃ -COOH
Ac. caproïque	Ac. hexanoïque	C6:0	H ₃ C-(CH ₂) ₄ -COOH
Ac. énanthique	Ac. heptanoïque	C7:0	H ₃ C-(CH ₂) ₅ -COOH
Ac. caprylique	Ac. octanoïque	C8:0	H ₃ C-(CH ₂) ₆ -COOH
Ac. pélagonique	Ac. nonanoïque	C9:0	H ₃ C-(CH ₂) ₇ -COOH
Ac. caprique	Ac. décanoïque	C10:0	H ₃ C-(CH ₂) ₈ -COOH
Ac. undécyclique	Ac. undécanoïque	C11:0	H ₃ C-(CH ₂) ₉ -COOH
Ac. laurique	Ac. dodécanoïque	C12:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₀ -COOH
Ac. tridécyclique	Ac. tridécanoïque	C13:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₁ -COOH
Ac. myristique	Ac. tétradécanoïque	C14:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₂ -COOH
Ac. pentadécyclique	Ac. pentadécanoïque	C15:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₃ -COOH
Ac. palmitique	Ac. hexadécanoïque	C16:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₄ -COOH
Ac. margarique	Ac. heptadécanoïque	C17:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₅ -COOH
Ac. stéarique	Ac. octodécanoïque	C18:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₆ -COOH
Ac. arachidique	Ac. éicosanoïque	C20:0	H ₃ C-(CH ₂) ₁₈ -COOH
Ac. béhénique	Ac. docosanoïque	C22:0	H ₃ C-(CH ₂) ₂₀ -COOH
Ac. lignocérique	Ac. tétracosanoïque	C24:0	H ₃ C-(CH ₂) ₂₂ -COOH
Ac. cérotique	Ac. hexacosanoïque	C26:0	H ₃ C-(CH ₂) ₂₄ -COOH

Tableau 7 : Principaux acides gras mono et polyinsaturés présents dans les composés biologiques

Nom usuel	Abréviation utilisée	Nomenclature chimique (IUPAC)	Nomenclature physiologique
Acide gras mono-insaturés (AGMI)			
Ac. palmitoléique		Ac. 7Z-hexadécénoïque	C16:1 n-7
Ac. oléique		Ac. 9Z-octadécénoïque	C18:1 n-9
Ac. érucique		Ac. 13Z-docosaénoïque	C22:1 n-9
Ac. nervonique		Ac. 15Z-tétracosaénoïque	C24:1 n-9
Acide gras poly-insaturés (AGPI)			
Ac. linoléique	AL	Ac. 9Z,12Z-octadécadiénoïque	C18:2 n-6
Ac. alpha-linolénique	ALA	Ac. 9Z,12Z,15Z-octadécatriénoïque	C18:3 n-3
Ac. stéaridonique	SDA	Ac. 6Z,9Z,12Z,15Z-octadécatétraénoïque	C18:4 n-3
Ac. arachidonique	AA ou ARA	Ac. 5Z,8Z,11Z,14Z-éicosatétraénoïque	C20:4 n-6
Ac. eicosa-pentaénoïque	EPA	Ac. 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-éicosapentaénoïque	C20:5 n-3
Ac. docosahexanoïque	DHA	Ac. 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaénoïque	C22:6 n-3

La nomenclature biochimique répertorie les AG en fonction du nombre d'atomes de carbone, du degré d'insaturation et de la position des liaisons doubles. Ainsi, ils sont notés **Cx:y n-z (ou ωz)** où x correspond au nombre de carbones, y à celui des liaisons doubles et z à la position de la première liaison double à partir de l'extrémité méthylée de la chaîne carbonée. Conséquemment, la valeur « y » est égale à 0 pour les acides gras saturés (AGS). Quant aux acides gras insaturés, ils sont répartis en deux familles : les mono-insaturés (AGMI), porteurs d'une seule liaison double, et les AGPI qui portent plusieurs insaturations. La position de la première insaturation est suspectée jouer un rôle essentiel en biologie et permet de faire la distinction entre divers types d'AGPI, comme l'acide α-linolénique (ALA ; C18:3) et ses dérivés de la famille des *n-3* ou ω3, l'acide linoléique (LA ; C18:2) et ses dérivés *n-6* ou ω6, ou encore l'acide oléique (OA ; C18:1) de type *n-9* ou ω9.

Les AG sont les constituants majeurs des différentes classes de lipides que sont les triglycérides, les phospholipides, les sphingolipides et les esters de cholestérol. Les triglycérides (TG) représentent 95 à 98% des lipides alimentaires ingérés. Ils sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée par trois AG. Dans l'organisme, les TG sont considérés comme des lipides de réserve, puisqu'ils sont surtout situés dans les tissus adipeux et constituent la forme principale de stockage de l'énergie. Les phospholipides (PL) rassemblent (i) les glycérophospholipides, constitués principalement d'une molécule de glycérol estérifiée par deux AG et un acide phosphorique lié à une fonction alcool aminée (choline, éthanolamine...) ou non (sérine ou inositol...), et (ii) les sphingophospholipides, dépourvus de glycérol

et composés d'AG, d'un alcool gras aminé comme la sphingosine ou un de ses dérivés, et d'un acide phosphorique (Figure 30).

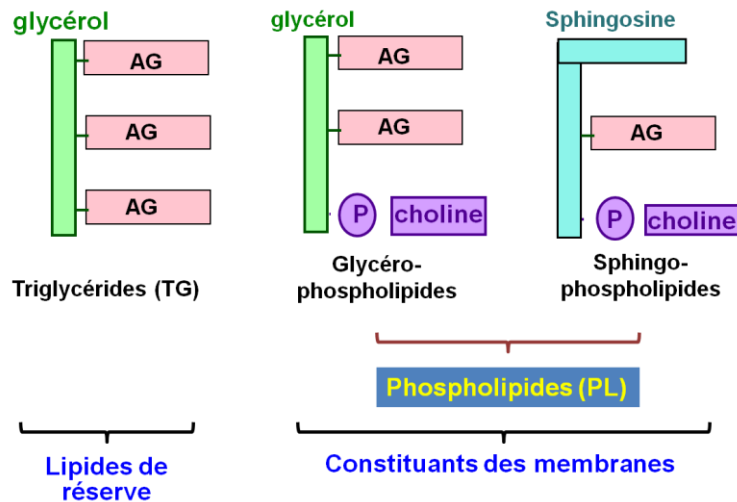


Figure 30 : Les esters d'acides gras

Les PL sont considérés comme des lipides de structure, car ils sont les constituants essentiels de la bicouche lipidique composant les membranes cellulaires dont ils assurent entre autre la fluidité. Les sphingolipides sont également présents dans les membranes cellulaires et jouent un rôle important dans la reconnaissance et la signalisation cellulaires.

b. Sources des AGPI

Les précurseurs métaboliques respectifs des familles d'AGPI *n*-3 et *n*-6, ALA et LA, ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme chez les mammifères, contrairement aux végétaux qui disposent des enzymes $\Delta 12$ et $\Delta 15$ désaturases nécessaires à leur synthèse respective à partir de l'OA. Ces précurseurs doivent donc obligatoirement être apportés par l'alimentation et sont ainsi qualifiés d'indispensables ou essentiels. Ils peuvent être apportés à l'organisme surtout par la consommation d'huiles végétales issues principalement de tournesol, arachide, maïs et pépin de raisin pour LA, colza, lin, noix, et soja pour ALA qui ne représente que moins de 1% des AG dans les huiles de maïs, tournesol et olive. Ces deux précurseurs peuvent conduire à la synthèse de dérivés à plus longue chaîne par des désaturations et élongations successives, situées dans le réticulum endoplasmique et les peroxysomes de la cellule, composant donc deux voies métaboliques parallèles et en compétition pour les mêmes enzymes. Les liaisons doubles et atomes de carbone supplémentaires sont ajoutés du côté de l'extrémité carboxyle, conservant ainsi la structure *n*-6 ou *n*-3 des précurseurs d'origine végétale (Figure 31).

De nombreux travaux montrent que le taux de conversion de l'ALA en dérivés plus longs et plus insaturés comme l'acide docosahexaénoïque (DHA ; C22:6 *n*-3) est très faible chez l'homme (< 0,1 %), suggérant que l'apport alimentaire du précurseur soit une source trop limitée pour satisfaire la totalité

des besoins en DHA et AGPI à longue chaîne (AGPI-lc) des tissus humains, en particulier chez les personnes âgées (Pawlosky *et al.*, 2001 ; Williams & Burdge, 2006 ; Plourde & Cunnane, 2007). Par ailleurs, des études cliniques ont montré qu'une supplémentation alimentaire avec des doses croissantes d'ALA induit l'accumulation de dérivés intermédiaires comme les acides eicosapentaénoïque (EPA ; C20:5 *n*-3) et docosapentaénoïque (DPA ; C22:5 *n*-3) dans le plasma, sans pour autant élever la teneur plasmatique en DHA (Arterburn *et al.*, 2006). Cette difficulté à garantir l'approvisionnement en DHA fait de cet AGPI-lc un composé que certains biochimistes envisagent de classer désormais parmi les AG indispensables, dont le régime alimentaire est la principale source, sinon la seule, chez l'homme. Les algues sont les premiers producteurs d'EPA et DHA et s'accumulent le long de la chaîne alimentaire, essentiellement dans les fruits de mer et les poissons gras carnassiers des mers froides. Certains attribuent la grande richesse en DHA du tissu cérébral à l'origine marine de la vie, considérant que le développement particulier de l'encéphale des hominidés par rapport à celui des grands singes puisse s'expliquer par l'accès à des régimes alimentaires riches en produits marins (Cunnane *et al.*, 2007).

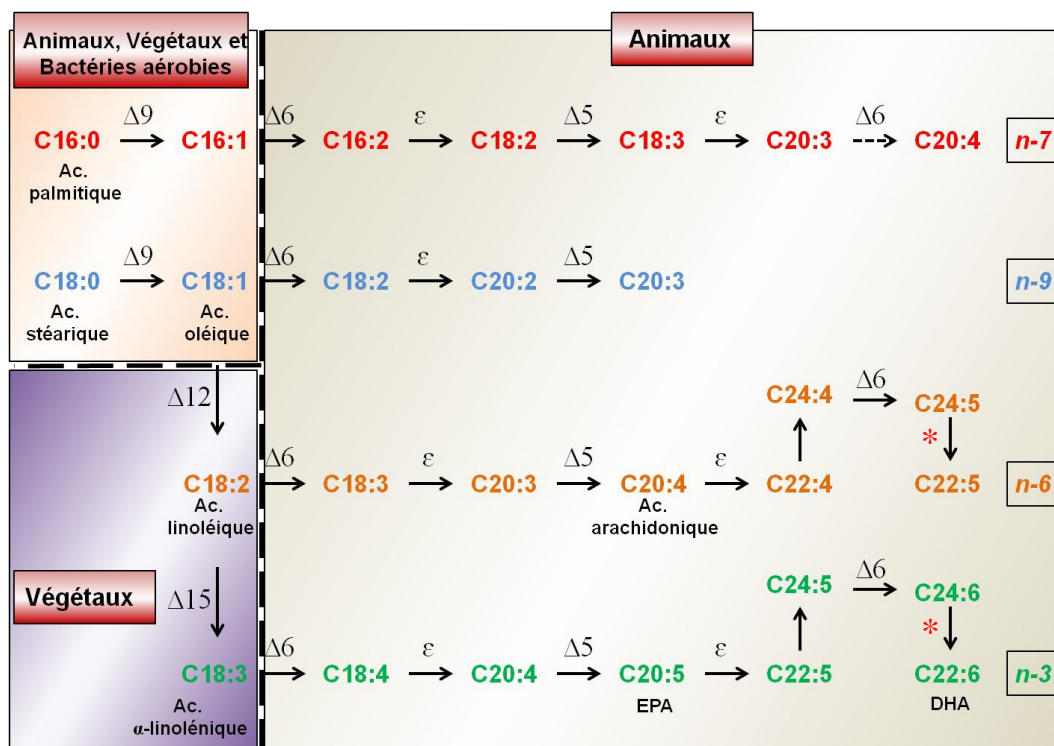


Figure 31 : Voies de biosynthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne

Le symbole Δ indique une désaturation, avec la place de la double liaison introduite repérée à partir du groupement carboxyle. Le symbole ϵ indique une élongation. L'astérisque rouge indique une β -oxydation peroxysomale.

La part occupée par les matières grasses dans la composition du régime alimentaire a fortement évolué depuis un siècle, de sorte que le régime alimentaire occidental actuel est déficient en AGPI *n*-3 et déséquilibré en faveur des AGPI *n*-6. Cette différence tend même à se creuser sur les AGPI-lc en limitant la conversion de l'ALA en EPA et DHA par compétition pour les élongases et désaturases entre

les séries *n-6* et *n-3*. Il a été estimé que la consommation des AGPI *n-6* est 15 à 20 fois plus élevée que celle des AGPI *n-3* (Simopoulos, 2011). D'autres auteurs ont calculé un ratio *n-6/n-3* proche de 10 dans l'alimentation américaine (Kris-Etherton *et al.*, 2000), un ratio LA/ALA de 11 dans l'échantillon de l'étude SU.VI.MAX de la population générale française (Astorg *et al.*, 2004) et de 9,9 chez les personnes âgées de 67,7 à 94,9 ans dans l'étude des 3 Cités (Féart *et al.*, 2007). Quoiqu'il en soit, les nutritionnistes s'accordent à recommander un ratio *n-6/n-3* optimal de 5 (Rapport du groupe PNNS sur les lipides, 2009, Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche, France).

c. Recommandations pour l'apport en AGPI n-3

Des recommandations pour les apports nutritionnels en AGPI *n-3* ont été formulées pour garantir un apport nutritionnel suffisant et prévenir les principales maladies chroniques, cardiovasculaires et neurodégénératives. Chez l'homme, la valeur de 30% de l'apport énergétique, ce qui équivaut à 77,8 g/j d'AG, constitue le besoin physiologique minimal en AG totaux. Un apport lipidique inférieur à 30% de l'apport énergétique réduit très significativement les apports en AGPI, dont le DHA, inférieurs aux besoins dans le contexte alimentaire des pays occidentaux (ANSES, 2011). L'apport quotidien recommandé en LA est de 2% de l'apport énergétique, soit 4,4 g/j, tandis que celui de l'ALA est de 0,8%, soit 1,8 g/j. Les données nouvelles, et en particulier celles relatives à la très faible conversion de l'ALA en DHA chez l'homme, conduisent à définir un besoin physiologique minimal pour le DHA. La valeur retenue par les comités de nutrition est de 0,1% de l'apport énergétique pour un adulte, soit 250 mg/j (Simopoulos *et al.*, 2000 ; ISSFAL, 2004 ; AFSSA, 2010). De façon cohérente, le comité technique des lipides alimentaires de l'*International Life Sciences Institute* nord-américain a émis en 2008 une recommandation à hauteur d'un apport journalier de 500 mg de EPA+DHA pour prévenir les maladies cardiovasculaires (Harris *et al.*, 2009). Ce comité concluait alors également que : (i) EPA et DHA ne semblent pas réduire le risque de cancers, (ii) les connaissances disponibles sur la protection contre le déclin cognitif sont encore insuffisantes pour un éventuel ajustement des doses dans cet objectif, (iii) aucun indice existant ne peut suggérer le moindre effet toxique de ces AGPI à ces doses.

d. Biodisponibilité des acides gras

i. Absorption intestinale

Les AG apportés par l'alimentation ne sont généralement pas sous forme libre, mais sous forme de divers esters plus ou moins complexes. Les TG représentent la forme prédominante d'apports en AG. Mais ces TG ne peuvent pas franchir les membranes cellulaires et doivent être hydrolysés par le couple lipase/colipase pancréatique en acides gras libres afin de pouvoir être absorbés. Jusqu'à 70% des AG apportés par les lipides alimentaires sont libérés sous forme d'AG libres, le reste non hydrolysé demeurant associé au glycérol sous forme de monoacylglycérols (MAG). Les AG libres à chaîne courte et moyenne présentent une hydrosolubilité relative qui leur permet de traverser rapidement la barrière intestinale et parvenir au foie par la veine porte. Par contre, l'absorption des AGPI-lc est un phénomène

complexe en raison d'une hydrosolubilité très limitée. Leur absorption intestinale est classiquement décomposée en trois étapes successives : diffusion, trafic intracellulaire et contribution à la synthèse des lipoprotéines (Figure 32).

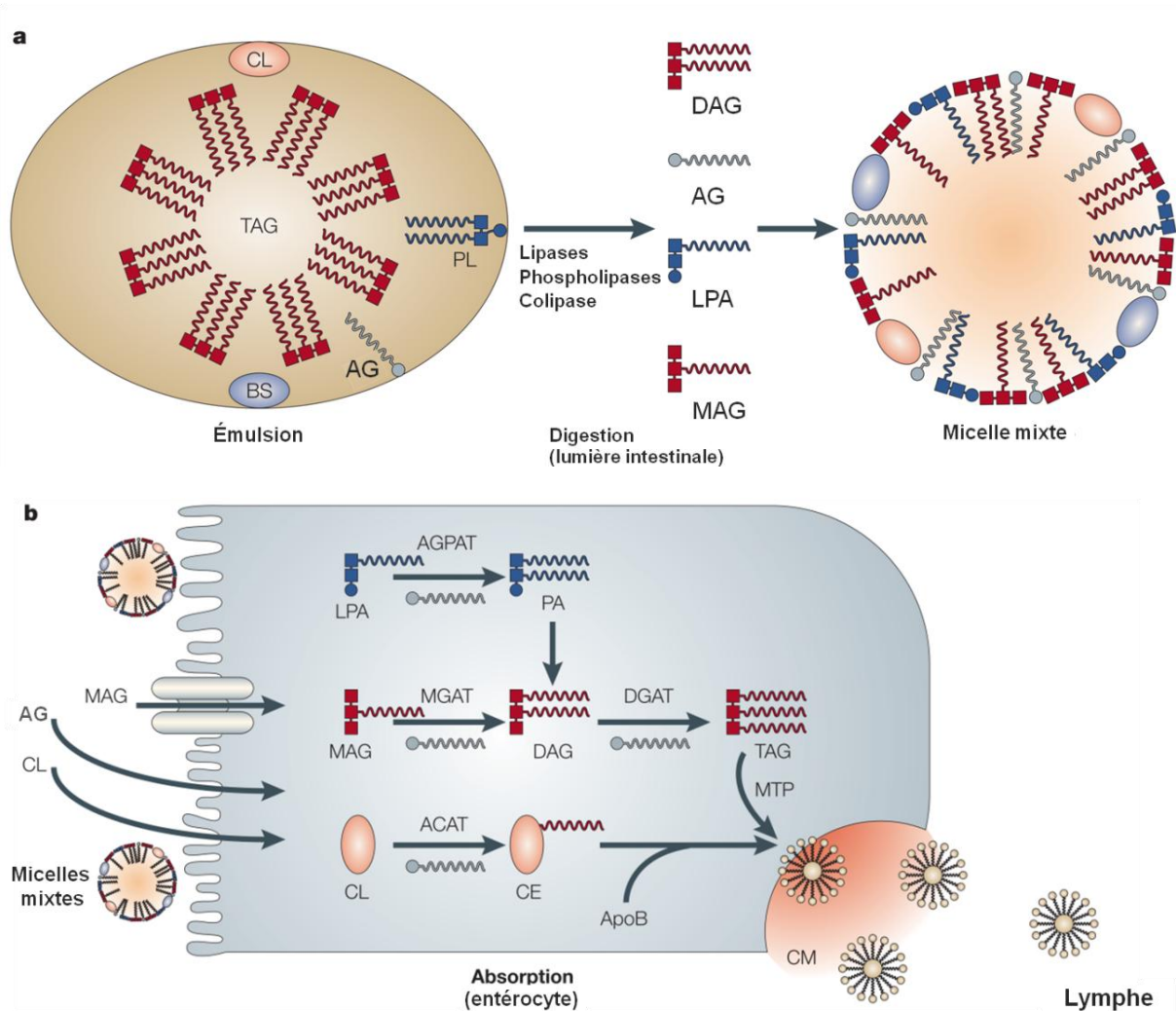


Figure 32 : Digestion et absorption des lipides alimentaires (d'après Shi & Burn, 2004)

a. La digestion alimentaire des lipides débute dans l'estomac, où les lipides sont partiellement hydrolysés par la lipase gastrique et forment de larges globules gras constitués d'un cœur hydrophobe de triglycérides ou triacylglycérols (TAG) entouré de molécules polaires (PL, cholestérol (CL), AG, protéines ionisées). Le processus de digestion se poursuit dans la lumière intestinale où les globules gras sont mélangés aux sels biliaires (BS) et aux sucs pancréatiques contenant les enzymes lipolytiques, formant une suspension aqueuse de petites gouttelettes lipidiques dont la structure permet d'optimiser l'action de ces lipases. Les monoacylglycérols (MAG), diacylglycérols (DAG) et AG libres produits par l'hydrolyse des lipides s'associent aux BS, au CL, aux acides lysophosphatidiques (LPA) et aux vitamines hydrosolubles pour former des micelles mixtes. Celles-ci transportent les produits issus de la digestion vers la bordure en brosse des entérocytes où elles sont absorbées. **b.** Les AG et MAG entrent dans les entérocytes par diffusion passive, facilitée par certains transporteurs. Ils sont ensuite ré-estérifiés dans le réticulum endoplasmique des entérocytes par des acyltransférases (MAG acyltransférase (MGAT), DAG acyltransférase (DGAT)) pour reformer des TAG. D'autre part, les LPA sont acylés en acide phosphatidique (PA) par l'acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT), avant d'être convertis en TAG. Enfin, le CL est estérifié en esters de cholestérol (CE) par l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT). Les TAG et les CE s'associent finalement à l'apolipoprotéine B (ApoB) pour former des chylomicrons (CM) qui rejoignent alors la circulation générale par le réseau lymphatique.

Une fois libérés, les AGPI-lc sont immédiatement incorporés dans des micelles mixtes, ce qui augmente leur solubilité dans les phases aqueuses et facilite leur diffusion par les entérocytes. Dans la cellule, ils sont réestérifiés en TG et pénètrent dans les citernes du réticulum endoplasmique par l'intermédiaire de la protéine microsomale MTTP de transfert des TG, qui joue un rôle essentiel dans la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines riches en TG (chylomicrons et VLDL). La synthèse de l'apoprotéine et l'assemblage des préchylomicrons ont lieu principalement dans le réticulum endoplasmique lisse. Ces lipoprotéines intermédiaires sont progressivement enrichies en TG, puis transférées par transport vésiculaire vers le Golgi où elles achèvent leur maturation. Une fois maturés, les chylomicrons fusionnent avec la membrane plasmique basolatérale des entérocytes. Ceci permet leur exocytose dans les espaces intercellulaires de l'épithélium intestinal et leur sécrétion dans la lymphe (Shi & Burn, 2004), avant de rejoindre la circulation sanguine par le canal lymphatique thoracique. Dans les circonstances physiologiques, le système digestif est ainsi capable de digérer et d'absorber au moins 95% des lipides alimentaires, sachant que des pertes fécales supérieures à 5% sont considérées comme un signe de malabsorption.

ii. Distribution tissulaire

Lorsque les chylomicrons atteignent les capillaires des tissus périphériques, les TG sont une nouvelle fois hydrolysés en AG, puis stockés dans le tissu adipeux ou utilisés comme substrat énergétique dans le muscle strié squelettique. Les TG et les esters de cholestérol résiduels qui n'ont pas été utilisés forment les lipoprotéines rémanentes qui rejoignent le foie (Williams, 2008). Les AG les plus abondants dans le plasma sont les AGS palmitique (C16:0) et stéarique (C18:0), ainsi que les AGI OA et LA. Les AGPI-lc *n*-3 les plus abondants dans le régime alimentaire, mais aussi dans le plasma et la plupart des tissus, sont l'ALA et ses deux dérivés à longue-chaîne EPA et DHA. Le DHA est en outre l'AGPI dont la concentration présente les plus grandes variations selon les organes. Alors que des quantités minimales d'ALA et d'EPA sont présentes dans la plupart des tissus, les quantités de DHA représentent en moyenne 5 à 30 fois celles de l'EPA (Figure 33), alors que ce rapport est de 100 dans le cerveau et la rétine (Arterburn *et al.*, 2006). L'acide arachidonique (ARA ; C20:4 *n*-6) est également abondant dans la plupart des tissus, mais sa distribution tissulaire est différente de celle du DHA. Dans le tissu adipeux, constitué d'AG stockés sous la forme de TG, c'est le LA qui est l'AGPI le plus abondant. Très peu d'EPA et de DHA y sont présents, confirmant ainsi que les AGPI-lc *n*-3 sont très peu stockés et doivent être régulièrement apportés par l'alimentation (Arterburn *et al.*, 2006).

iii. Biodisponibilité

La biodisponibilité définit la vitesse et l'étendue avec lesquelles une substance active est absorbée à partir de la formulation administrée et devient disponible au site d'action (EMEA, Human guidelines 2001). La biodisponibilité des AG des lipides alimentaires est liée à l'AG lui-même, ainsi qu'à la nature du vecteur (TG, PL, ester de cholestérol...). Elle dépend aussi de phénomènes physiologiques

complexes faisant intervenir des étapes d'émulsification, d'hydrolyse, de solubilisation, de transport et d'absorption par les entérocytes. Les TG ou les PL doivent ensuite être resynthétisés et transportés sous forme de chylomicrons dans la lymphe puis dans le sang vers les différents tissus de l'organisme.

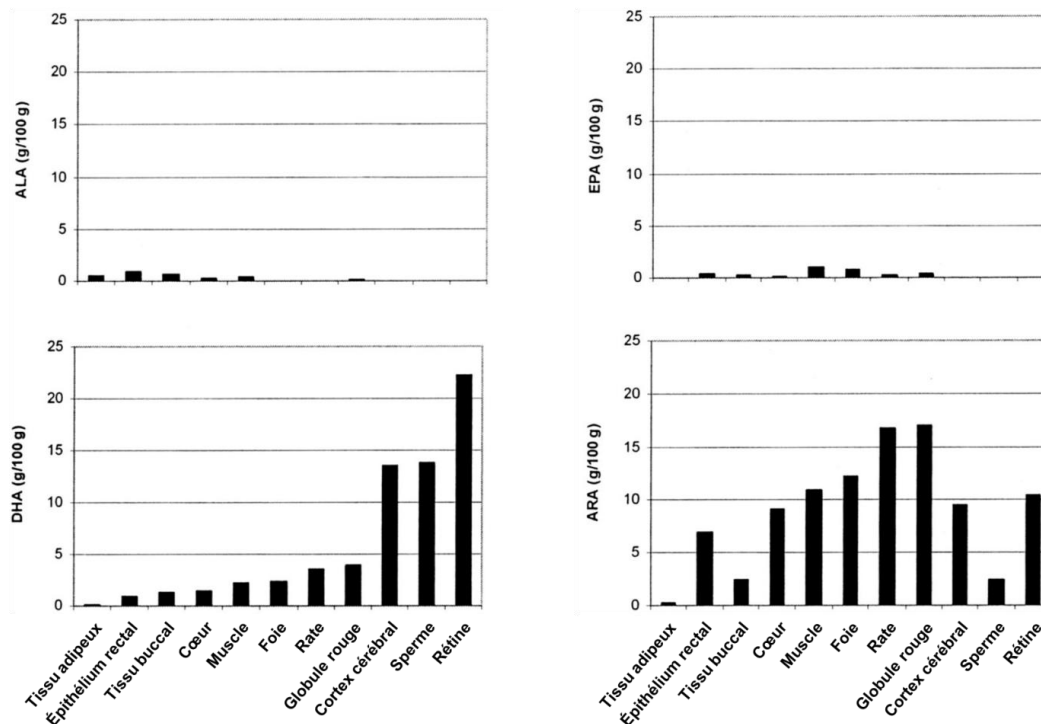


Figure 33 : Proportions des acides gras dans les tissus humains d'adultes sous régime occidental (d'après Arterburn *et al.*, 2006)

En fait, la forme d'apport des AG pourrait avoir un impact sur le métabolisme lipidique et pourrait induire des effets physiologiques différents. Une méta-régression des études de supplémentation en ALA chez l'homme a montré que dans le contexte d'un régime alimentaire déséquilibré en faveur des AGPI *n*-6 par rapport aux *n*-3 tel que le régime occidental actuel, de grandes quantités d'ALA ingérées n'engendraient qu'une faible augmentation de la concentration plasmatique d'ALA et d'EPA, et n'avaient aucun effet sur le DHA (Arterburn *et al.*, 2006). À l'inverse, une supplémentation en DHA conduit à une augmentation dose-dépendante et des concentrations plasmatiques en DHA, saturable pour des doses de DHA ingérées supérieures ou égales à 2 g/j. Une supplémentation en EPA à une dose de 4 g/j conduit à une augmentation dose-dépendante de l'EPA plasmatique, mais pas du DHA. Enfin, une supplémentation en EPA+DHA conduit à une augmentation de l'EPA plasmatique ainsi que du DHA, qui atteint un plateau à une dose ingérée de 1,2 g/j d'EPA+DHA. Les auteurs ont pu conclure que la meilleure façon d'augmenter les concentrations plasmatiques d'un AGPI *n*-3 particulier est de supplémenter l'alimentation avec cet AGPI spécifiquement. En outre, les concentrations tissulaires en AGPI-*lc n*-3 augmentent en réponse à l'apport alimentaire en EPA ou en DHA. Chez l'homme, deux études ont montré après biopsie une augmentation des concentrations en EPA et DHA dans le muscle cardiaque et le tissu musculaire squelettique après une supplémentation en huile de poisson. Chez

l'animal, les études suggèrent que les concentrations d'EPA et de DHA dans le cœur, le cerveau, la rétine, le foie, les globules rouges et la moelle osseuse augmentent et la concentration d'ARA diminue de manière dose-dépendante après supplémentation en DHA (Arterburn *et al.*, 2006). En accord avec ces études, la plupart des études de supplémentation reportent une corrélation positive entre la consommation de poisson, principal aliment source d'AGPI-*lc n-3*, et les concentrations plasmatiques d'EPA et de DHA (Hjartåker *et al.*, 1997 ; Dahl *et al.*, 2011). Cependant, les corrélations observées sont parfois relativement faibles, ce qui suggère que la variabilité plasmatique des AGPI-*lc n-3* ne puisse être que partiellement expliquée par la consommation de poisson. D'autres facteurs semblent influencer sur leur biodisponibilité, en particulier l'espèce animale source ainsi que le mode de préparation alimentaire (Chung *et al.*, 2008a). En effet, une étude a montré que seul l'apport alimentaire d'AGPI-*lc n-3* provenant des poissons gras était significativement corrélé aux concentrations plasmatiques en EPA et DHA, suggérant que ces acides gras soient incorporés ou métabolisés différemment selon l'espèce source (Philibert *et al.*, 2006).

La forme de vectorisation des AG est importante aussi, car il a été montré que la supplémentation en ARA mène à un enrichissement de cet AG dans les lipides cérébraux 2,1 fois plus importante s'il est apporté sous forme de PL que sous forme de TG (Wijendran *et al.*, 2002), suggérant que le PL soit un substrat métabolique plus actif. Valenzuela *et al.* (2005a) ont observé que l'apport de DHA sous forme de PL est plus efficace pour assurer le transfert de l'AG vers les différents tissus que sous forme de TG ou d'ester éthylique. Lagarde *et al.* (2001) ont montré que la forme préférentielle du DHA au niveau du cerveau est la lysophosphatidylcholine, résultant de l'hydrolyse partielle de phosphatidylcholines ayant éliminé l'AG en position *sn-2* par l'action enzymatique d'une phospholipase A₂.

De nombreuses études ont évalué l'absorption et la biodisponibilité des AGPI-*lc n-3* sous forme d'esters éthyliques (EE) résultant d'une transestérification synthétique de l'AG avec une molécule d'éthanol. La plupart de ces études ont comparé la quantité d'EPA et d'DHA dans le plasma sanguin après ingestion d'AG sous forme de TG ou d'EE. Bien que certaines études aient démontré un taux d'absorption similaire pour les deux types d'huile (Krokan *et al.*, 1993), la plupart suggèrent que les TG soient mieux absorbées (Dyerberg *et al.*, 2010 ; Neubronner *et al.*, 2011), avec une teneur en EPA et en DHA retrouvés dans le sang 50% plus élevée pour les TG naturels que pour les EE (Beckermann *et al.*, 1990). L'incorporation d'EPA dans les lipides plasmatiques était considérablement plus faible et plus lente lorsque l'AG était administré sous forme d'EE (el Boustani *et al.*, 1987). De façon cohérente, les concentrations de lipides plasmatiques en EPA et en DHA étaient considérablement plus élevées suite à l'ingestion de portions quotidiennes de saumon comparativement à 3 capsules d'huile de poisson avec EE (Visioli *et al.*, 2003). Chez le rat, une supplémentation en DHA sous forme de TG a permis de mesurer des concentrations de DHA dans les érythrocytes et le plasma plus élevées qu'avec le DHA-EE (Valenzuela *et al.*, 2005b). Cette différence de biodisponibilité entre les deux formes étudiées pourrait s'expliquer par une résistance supérieure de la liaison AG-éthanol à la lipase pancréatique

comparativement à l'hydrolyse des TG (Yang *et al.*, 1990). De plus, la conversion des AG libres en TG par les entérocytes est logiquement favorisée à partir des TG qui apportent leur propre monoglycéride substrat (Figure 32), alors que l'EE couplé à l'éthanol n'en contient pas et doit donc obtenir ce substrat d'une autre source. La resynthèse des TG est alors retardée, ce qui explique que le relargage dans la circulation est plus efficace à partir de TG. De plus, ce retard pourrait provoquer une augmentation des AG libres et donc leur oxydation.

e. AGPI n-3 et cerveau : du normal au pathologique

Au cours des deux dernières décennies, de nombreux travaux ont apporté des arguments forts en faveur de l'implication des AG indispensables dans le fonctionnement cérébral, même si les mécanismes sont encore loin d'être élucidés. Cette question peut être abordée d'une part par l'étude du rôle des AGPI *n-6* et *n-3* sur la physiologie cérébrale, d'autre part par la recherche de relations entre le statut en ces AGPI et les dysfonctionnements et les maladies du SNC. Le grand intérêt de mener des études sur des modèles animaux, de façon nécessairement complémentaire à celles chez l'homme, réside dans le fait de permettre l'administration de régimes alimentaires parfaitement contrôlés, conçus en introduisant des déficiences ou des suppléments en nutriments particuliers afin d'évaluer les conséquences sur différents plans, métabolique, neurochimique et comportemental. Les données concernant les relations entre le statut en AGPI-lc et les dysfonctionnements du SNC sont encore partielles. Ces dysfonctionnements regroupent les atteintes neurologiques, en particulier les maladies neurodégénératives caractérisées par des déficits cognitifs associés à des pertes synaptiques puis neuronales précoces et progressives dans certaines régions cérébrales particulières.

i. AGPI à longue chaîne dans le cerveau

Après le tissu adipeux, le SNC présente les teneurs en lipides les plus élevées de l'organisme. Par contre, le cerveau montre une sélectivité pour les AGPI-lc (Söderberg *et al.*, 1991), alors que le tissu adipeux accumule préférentiellement les AGS (Li *et al.*, 2010). Les AG cérébraux représentent environ la moitié de sa masse sèche et ils sont principalement présents sous forme de PL (Söderberg *et al.*, 1991). Les trois classes majoritaires de PL cérébraux sont la phosphatidylcholine (PC, 42-44 %), la phosphatidyléthanolamine (PE, 36-40 %) et la phosphatidylsérine (PS, 11-13 %), aux côtés desquels existent également des classes minoritaires telles que la sphingomyéline (SM, 5-6 %) et le phosphatidylinositol (PI, 2-3 %) (Sastri, 1985). Ces classes de PL cérébraux présentent des proportions différentes d'AG, majoritairement l'ARA et le DHA. Les PE et PS sont les phospholipides les plus riches en AGPI-lc *n-3* et notamment en DHA (Garcia *et al.*, 1998 ; Salem *et al.*, 2001). Le cerveau semble en effet un organe très sélectif dans le choix des AG qui le composent. Cette sélectivité suggère un rôle spécifique de chacun de ces lipides. Le DHA est l'AGPI prédominant dans le cortex cérébral et la rétine (Pifferi *et al.*, 2012), représentant 60% de tous les AG estérifiés dans les PL de la membrane neuronale (Lukiw & Bazan, 2008). Au sein des différentes structures cérébrales, il est préférentiellement

retrouvé dans les membranes synaptiques, la myéline, les membranes microsomales et mitochondriales et les microvaisseaux cérébraux (Grandgirard *et al.*, 1994 ; Jones *et al.*, 1997 ; Suzuki *et al.*, 1997). L'incorporation de cet AG dans la membrane de la cellule nerveuse du cerveau et de la rétine est une étape majeure de la maturation fonctionnelle du SNC au cours du développement périnatal.

- **Rôle structural et fonctionnel du DHA dans les membranes neuronales**

De nombreuses études ont montré l'importance du DHA dans la période cruciale concernant la mise en place du SNC et sa maturation, c'est-à-dire, chez l'homme, durant le dernier trimestre de la vie fœtale comme lors des 18 premiers mois de la vie, période durant laquelle se fabriquent quelque 250.000 neurones chaque minute... L'apport alimentaire et le statut en DHA de la mère sont donc des paramètres particulièrement importants durant la gestation et lors de l'allaitement. Il est intéressant de noter que les AGPI traversent sélectivement la barrière placentaire vers la circulation du fœtus (Gil-Sánchez *et al.*, 2011), mais ils peuvent aussi être transmis de la mère aux nouveaux-nés par la lactation. La plupart des études, mais pas toutes, semblent indiquer un développement psychomoteur plus rapide, de meilleures performances cognitives et une acuité visuelle supérieure chez les jeunes ayant bénéficié de l'apport en DHA (Campoy *et al.*, 2012). Si la réalité des effets bénéfiques restent encore controversée, il semble unanime par contre que des carences en AGPI *n-3* puissent se solder par de nombreux déficits fonctionnels, comme en témoignent de nombreuses études menées *in vivo* sur des portées de souris ou de rats (Innis *et al.*, 2007 & 2008 ; Brenna, 2011). C'est ce qui a conduit certains chercheurs à proposer une supplémentation nutritionnelle systématique des femmes enceintes et des mères en période d'allaitement, mais aussi à enrichir les laits maternisés avec des teneurs en AGPI *n-3* proches de celles retrouvées dans le lait maternel (Guesnet & Alessandri, 2011).

L'importance fonctionnelle d'un apport de DHA durant la période périnatale suggère que l'AG puisse jouer un rôle structural en tant que constituant des membranes des neurones néoformés. Les taux de DHA présents dans la bicouche doivent très certainement influencer sur les caractéristiques physicochimiques, l'architecture et la micro-organisation des membranes, afin qu'elles acquièrent plus aisément toutes leurs fonctionnalités. C'est sans doute aussi ce même rôle qui pourrait contribuer aux propriétés neuroprotectrices du DHA. L'action de l'AG après son incorporation membranaire peut s'exercer directement, par exemple en favorisant la création de micro-environnements membranaires flexibles facilitant le juste positionnement et la topographie optimale nécessaires à l'activité des récepteurs, transporteurs, enzymes et canaux ioniques ancrés aux membranes, ou indirectement, en induisant la formation de microdomaines ordonnés composant des plateformes de signalisation actives.

Contrairement aux AGS qui ont une conformation droite et rigide, le DHA, incorporé dans une proportion particulièrement élevée dans la bicouche lipidique des membranes neuronales, peut adopter différentes conformations, ce qui détermine en conséquence les propriétés des membranes et conditionne leur intégrité fonctionnelle (Lukiw & Bazan, 2008). Avec ses six liaisons doubles, la chaîne

carbonée du DHA peut présenter un certain nombre de courbures qui lui permettent d'adopter différentes conformations. Ceci lui permet de moduler son encombrement stérique et d'influer ainsi sur la fluidité des membranes, mais aussi sur sa perméabilité, sa viscosité et son élasticité (Saiz & Klein, 2001 ; Stillwell & Wassall, 2003 ; Rajamoorthi *et al.*, 2005). Ces propriétés sont indispensables pour assurer les échanges ioniques transmembranaires, ainsi que la formation et la fusion des vésicules, donc pour garantir la progression du potentiel d'action et le transfert de l'influx nerveux. En fait, les six liaisons doubles rigides du DHA en conformation *cis* devraient logiquement réduire la flexibilité du DHA. Mais les études expérimentales de RMN suggèrent au contraire une grande flexibilité du DHA (Feller, 2008), capable de réaliser de rapides interconversions (Figure 34) entre des conformations spatiales variées (Salem *et al.*, 2001). Ce paradoxe a été expliqué par des méthodes de simulation de dynamique moléculaire qui mis en évidence des propriétés énergétiques particulières des liaisons C–C mobiles du DHA comparativement à celles des AGS, ce qui lui confère une capacité de réorganisation spatiale très rapide produisant une haute flexibilité et une grande dynamique (Feller, 2008). Cette flexibilité induit un rapprochement du groupement méthyle terminal de la surface membranaire (Saiz & Klein, 2001), ce qui entraîne une diminution de l'épaisseur de la membrane, facilite les interactions avec les protéines, et augmente la vitesse de transduction du signal et la neurotransmission (Innis, 2007).

Les AGPI-*lc* jouent aussi un rôle dans la formation des microdomaines membranaires. Des études suggèrent notamment que la faible affinité des AGPI-*lc* tels que le DHA pour le cholestérol favoriserait la ségrégation latérale de microdomaines riches ou pauvres en cholestérol (Shaikh *et al.*, 2004 ; Wassall & Stillwell, 2008 ; Yaqoob, 2009). Les rafts ont ainsi été décrits comme des régions membranaires rigides riches en sphingolipides et en cholestérol (Figure 35), ainsi qu'en certaines protéines spécifiques et protéines à ancres GPI ou glycosylphosphatidylinositol (Simons & Ikonen, 1997).

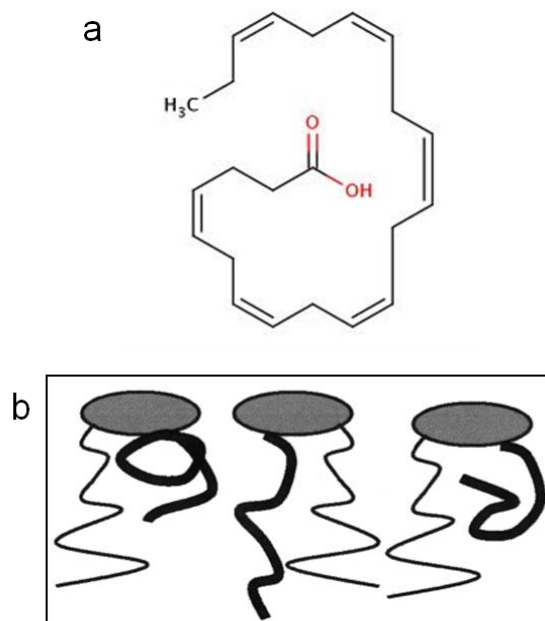


Figure 34 : Représentation de l'acide docosahexaénoïque (DHA)

a) DHA (C22:6 n-3) en structure plane, b) Représentation schématique de la liberté conformationnelle du DHA (d'après Salem et al., 2001). Le DHA est converti rapidement d'une conformation spatiale en boucle à une autre tendue. Le centre de gravité du DHA est proche de l'interface lipide-eau.

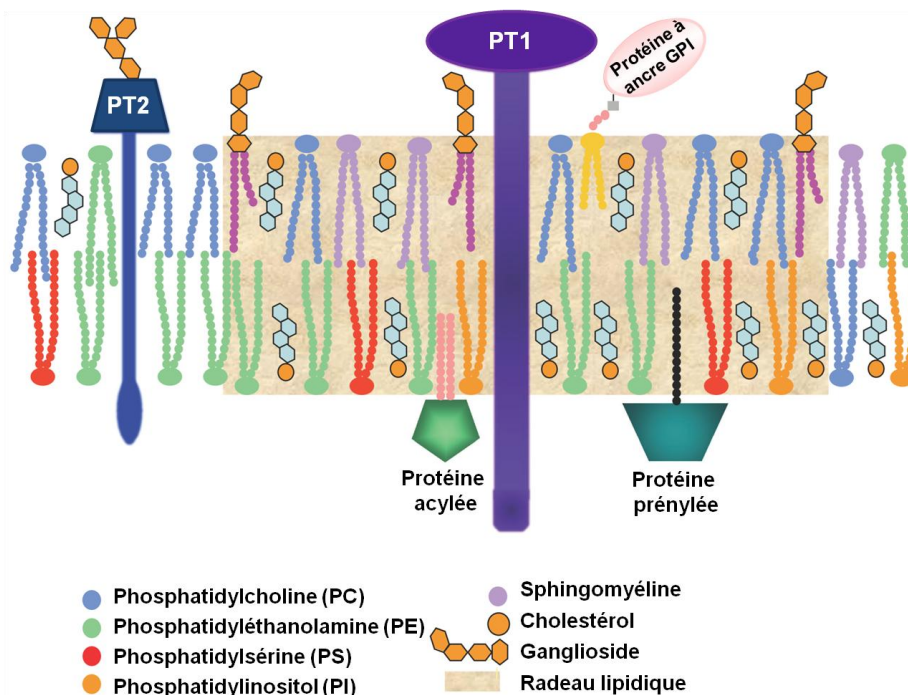


Figure 35 : Représentation schématique d'un radeau lipidique (d'après Silveira e Souza *et al.*, 2011)

Les radeaux lipidiques sont des régions membranaires rigides riches en cholestérol. Le feuillet externe est riche en sphingolipides, PC et gangliosides, tandis que le feuillet interne est riche en PS et PE. Il existe des protéines liées au feuillet interne de la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un AG (protéines acylées) ou d'un alcool gras (protéines prénylées), et des protéines ancrées dans le feuillet externe par l'intermédiaire du PI. Les protéines transmembranaires (PT1 et 2) traversent la membrane entière.

Contrairement à la majorité des autres PL, les sphingolipides sont riches en AGS. Par leur nature, ils forment des interactions moléculaires très solides avec des AGS peu mobiles et bien alignés, et en conséquence un assemblage compact et difficile à briser. Le cholestérol rigidifie davantage le tout, ce qui rend ces portions membranaires insolubles dans la plupart des détergents (Brown & London, 2000). La position du DHA, dans ces domaines ou en dehors, reste encore sujette à discussion, même si les physicochimistes considèrent les AGPI incompatibles avec le cholestérol et les sphingolipides, l'un augmentant plutôt la fluidité de domaines moins organisés, tandis que les autres la diminuent dans des domaines ordonnés. De ce fait, Wassall & Stillwell (2008 & 2009) considèrent que les radeaux sont constitués exclusivement d'AGS, obligeant donc le DHA à s'insérer hors de ces structures. Cependant, Williams *et al.* (2012) viennent de rapporter que le DHA peut, au moins partiellement, s'incorporer dans les radeaux à des taux doubles de ceux de l'EPA. Ceci démontre que tous ces lipides doivent pouvoir interagir pour assurer l'équilibre de la membrane dans son ensemble et il a été montré que le DHA peut en effet modifier la taille, la distribution et la composition de ces microdomaines particuliers (Ma *et al.*, 2004 ; Chapkin *et al.*, 2008). En conséquence de ces différentes propriétés, une forte augmentation du

cholestérol membranaire, notamment au cours du vieillissement, promeut une rigidification de la membrane (Yehuda *et al.*, 2002). Ce processus semble pouvoir être inversé par le DHA (mais pas l'EPA), comme il l'a été observé chez des rats hypercholestérolémiques (Hashimoto *et al.*, 2006).

- **Action des AGPI-*lc* libres**

Si les AGPI sont d'importants constituants membranaires, ils sont aussi continuellement libérés des PL membranaires sous l'action des phospholipases A₂ (PLA₂) qui clivent la liaison ester en position *sn*-2. Différentes formes de PLA₂ ont été décrites dans le cerveau, parmi lesquelles se trouvent notamment la PLA₂ sécrétée (sPLA₂), la PLA₂ cytosolique dépendante du Ca²⁺ (cPLA₂) et la PLA₂ indépendantes du Ca²⁺ (iPLA₂) (Farooqui & Horrocks, 2004). Ces différentes formes enzymatiques se caractérisent par leur structure, leurs propriétés, leur spécificité de substrat et leur localisation subcellulaire. Ainsi, l'isoforme cPLA₂, répartie uniformément au sein du cerveau, est exprimée aussi bien au niveau des neurones que des astrocytes (Farooqui & Horrocks, 2004) et présente une plus forte affinité pour l'ARA (Leslie, 2004). L'isoforme iPLA₂ est majoritaire au niveau cérébral ou elle présente une spécificité pour le DHA des PL membranaires (Strokin *et al.*, 2003). Elle contribue à hauteur de près de 70% de l'activité PLA₂ dans le cerveau, notamment dans diverses régions du cerveau essentielles aux processus de mémorisation, dont l'hippocampe (Farooqui & Horrocks, 2004). Enfin, la sPLA₂, sécrétée en réponse à des stimuli particuliers, ne semble avoir ni spécificité régionale, ni spécificité de substrat au niveau cérébral (Farooqui & Horrocks, 2004). Une fois libres, les AGPI sont majoritairement réincorporés dans les PL membranaires (Chen *et al.*, 2008). Mais ils peuvent également être convertis en médiateurs oxygénés (eicosanoïdes et docosanoïdes principalement), métabolisés par la voie de la β -oxydation afin de fournir de l'énergie, réguler l'activité de certaines protéines et l'expression de certains gènes, ou diffuser vers le plasma.

- ii. Modulation de la composition cérébrale en DHA par le régime alimentaire

La concentration cérébrale en DHA augmente lors du développement post-natal et diminue avec l'âge (Innis, 2008). Elle est aussi altérée par la modification de la composition du régime alimentaire en DHA (Connor *et al.*, 1990), contrairement à celle de l'ARA (Hsieh & Brenna, 2009). L'effet du régime alimentaire sur le DHA a été rapporté chez l'animal ainsi que chez l'homme. En effet, une étude chez les rats adultes a montré qu'une forte consommation d'AGS diminue significativement le DHA cérébral et augmente le ratio *n*-6/*n*-3, même après une supplémentation en DHA pendant la période gestation-lactation (Sharma *et al.*, 2012). Ainsi, la carence de l'apport en AGPI *n*-3 dès cette période précoce se solde par une chute du DHA cérébral de 50%, suivie d'une incorporation accrue compensatoire de DPA *n*-6 (Aïd *et al.*, 2003). Des résultats similaires ont été obtenus chez l'homme, puisqu'une étude a notamment montré une chute de 50% du DHA dans le cerveau de nouveaux-nés nourris avec des formules dépourvues en DHA comparativement aux bébés nourris au lait maternel (Cunnane *et al.*, 2000). De plus, les études d'autopsies d'enfants ayant été alimentés avec du lait formulé sans DHA ont

montré des concentrations de DHA nettement diminuées dans le cortex par rapport à ceux nourris au sein (Farquharson *et al.*, 1995). Ces études suggéraient que le DHA alimentaire détermine le statut cérébral en DHA. Elles montraient en outre que le cerveau humain n'est pas complètement protégé contre une carence liée à un régime déficient en DHA. Certes, la composition lipidique suite à une déficience est altérée dans toutes les structures cérébrales, mais l'amplitude des variations diffère d'une région à l'autre. Ainsi, le cortex frontal semble plus sensible comparé à d'autres régions telles que l'hippocampe, l'hypothalamus, le striatum et le cervelet (Levant *et al.*, 2007). Il convient de mentionner que les concentrations d'ARA et de DHA dans le cerveau sont beaucoup moins sensibles aux variations d'apport alimentaire en AGPI que les concentrations dans les autres tissus (Goustard-Langelier *et al.*, 1999 ; Alessandri *et al.*, 2004). Les AGPI et le DHA en particulier semblent en effet posséder une demi-vie particulièrement élevée, ce qui suggère l'existence de mécanismes d'homéostasie capables de limiter la perte de DHA cérébral en cas d'apports irréguliers ou lors de régimes carencés en cet AG (Rapoport, 2008). En effet, une carence alimentaire en AGPI *n*-3 de 15 jours ne modifie pas la teneur membranaire du cerveau en DHA, alors qu'elle baisse fortement dans le foie et le tissu adipeux (DeMar *et al.*, 2004).

La supplémentation en AGPI *n*-3 favorise donc l'accumulation du DHA dans les organes et surtout dans le cerveau. Ainsi, un enrichissement en DHA et EPA dans le sérum, le foie et le cerveau a été mis en évidence après une supplémentation chez le jeune rat. De plus, les apports alimentaires riches en AGPI-*lc n*-3 des femelles en gestation induit une augmentation significative du contenu plasmatique et hépatique en ces AG, associée à une diminution de la proportion en ARA (Childs *et al.*, 2010). Ces modulations du contenu lipidique sont retrouvées dans de moindres proportions au niveau cérébral, avec des différences selon les régions, tout comme pour le déficit. Ainsi, suite à un enrichissement du régime pendant la gestation et à l'âge adulte, l'hippocampe et le bulbe olfactif semblent accumuler préférentiellement le DHA comparativement au cortex frontal (Chung *et al.*, 2008b).

iii. Composition cérébrale en AG au cours du vieillissement normal ou pathologique

Nous avons déjà indiqué que les propriétés physicochimiques des membranes cellulaires sont conditionnées par la composition des lipides membranaires, en particulier en AGPI, et que la richesse du cerveau en AGPI sensibilise l'organe à la peroxydation lipidique augmentée dans le vieillissement cérébral (Floyd & Hensley, 2002). Sur la base de ces observations, la communauté scientifique s'est interrogée dès les années 1970 sur les conséquences d'un changement de composition des lipides cérébraux sur les capacités fonctionnelles du SNC lors du vieillissement normal ou pathologique.

L'effet de l'âge sur la composition en AG des PL membranaires a fait l'objet de plusieurs investigations chez l'animal. Ainsi, des variations importantes de la composition en AG des PE et PS ont été observées dans l'hippocampe de rats âgés, avec une augmentation des AGMI pour les PE et PS et une diminution des AGPI *n*-3, en particulier du DHA (Favrelière *et al.*, 2003). De plus, Ulmann *et al.*,

(2001) ont également montré une chute significative en AGPI *n*-6 au sein des PS, PC et PI chez les rats âgés, accompagnée d'une baisse moins marquée en AGPI *n*-3.

Chez l'homme, de nombreuses données attestent de l'effet de l'âge sur la teneur en lipides et la composition en AG des PL des membranes cérébrales. Ainsi, l'étude de Söderberg *et al.* (1991) est la première à avoir mis en évidence une baisse de 26% de teneurs en PC et PE, chez des sujets âgés de 89 à 92 ans dans certaines régions cérébrales comme l'hippocampe. Elle a aussi montré pour la première fois une altération de la composition de ces PL dans la MA par rapport aux sujets contrôles du même âge, avec une diminution de la proportion des AGPI-1c (ARA, DHA) dans les PE de la substance grise frontale et de l'hippocampe, compensée par une augmentation de la proportion des AGS. De ces résultats a émergé l'hypothèse selon laquelle la modification du ratio AGS/AGPI dans les membranes neuronales pourrait être à l'origine d'altérations neurofonctionnelles impliquées dans la MA. D'autres études ont confirmé une diminution significativement plus importante des PL membranaires cérébraux, particulièrement des PE, dans la MA par rapport à celle observée dans le vieillissement normal (Plourde *et al.*, 2007). Dans le cortex frontal et l'hippocampe, les concentrations en PE et PC étaient diminuées respectivement de 20 à 30% et 36% chez des sujets âgés « normaux » par rapport à des jeunes adultes, mais de 50% dans la MA (Söderberg *et al.*, 1991 ; Guan *et al.*, 1999). Cependant, deux autres études n'ont pas signalé d'importants changements dans la composition en AG des PL, en particulier en DHA, du cortex cérébral de 15 patients atteints de MA (Skinner *et al.*, 1993), ou dans l'hippocampe de 8 patients (Corrigan *et al.*, 1998). Dans une publication plus récente, Lukiw *et al.* (2005) ont montré une diminution de 50% du DHA cérébral libre dans l'hippocampe et le cortex temporal de patients atteints de MA. Le plus intéressant est que les produits du métabolisme enzymatique du DHA, notamment la neuroprotectine D1, sont également diminués chez les patients MA (Lukiw *et al.*, 2005), alors que les produits tels que les neuroprostanes issus de l'oxydation du DHA sont augmentés (Reich *et al.*, 2001).

Ce changement entraîne une rigidité accrue des membranes neuronales, affectant très logiquement les propriétés fonctionnelles des cellules nerveuses. Fondamentalement, outre les carences liées à un déficit d'approvisionnement lié à une dénutrition prolongée, il y a trois façons d'expliquer le faible niveau des AGPI-1c membranaires dans le cerveau des personnes âgées (Yehuda *et al.*, 2002) :

- La diminution du taux de passage des AGPI à travers la BHE,
- La diminution du taux d'incorporation dans les lipides membranaires,
- La faible activité des enzymes $\Delta 6$ et $\Delta 9$ -désaturases.

f. AGPI n-3 et protection contre le stress amyloïde et la MA

i. Propriétés anti-amyloïdogènes et promotion de la survie cellulaire

Les propriétés neuroprotectrices du DHA ont été mises en évidence et élucidées sur un modèle *in vitro* de neurones exposés aux oligomères A β solubles. Ainsi, l'ajout de DHA en quantités nanomolaires dans le milieu de culture protège les neurones corticaux de rat contre la mort induite par le peptide A β (

Florent *et al.*, 2006). Une incubation minimale de 24 h semble cependant nécessaire, suggérant que le DHA doit être incorporé dans les PL membranaires pour exercer ses effets protecteurs. Il a été suggéré que le DHA peut protéger les neurones *in vitro* de l'accumulation et de la toxicité du peptide A β à la fois en maintenant les voies de signalisation de survie cellulaire et en inhibant l'induction des signaux pro-apoptotiques induites par ce peptide (Calon *et al.*, 2004 ; Lim *et al.*, 2005 ; Florent *et al.*, 2006).

Ainsi, le DHA pourrait stimuler la voie non amyloïdogène *in vitro* et donc diminuer la production de peptide A β (Sahlin *et al.*, 2007). De plus, la flexibilité du DHA conditionne la distribution et l'abondance des radeaux lipidiques, dont la structure pourrait moduler les mécanismes impliqués dans la neurodégénérescence. Il convient de signaler que les enzymes β - et γ -sécrétases responsables du clivage amyloïdogène de la protéine APP, sont localisées au niveau des radeaux, alors que l' α -sécrétase assurant le clivage non amyloïdogène est ancrée aux régions désordonnées de la membrane (Hicks *et al.*, 2012). L'enrichissement des radeaux en AGPI-*lc n-3* (EPA, DHA) entraînerait une séparation de phase et une redistribution locale des lipides (notamment une hausse des teneurs en PE par enrichissement en DHA), un remodelage des membranes et un déplacement sélectif des protéines. Ces modifications auraient des conséquences fonctionnelles majeures, notamment la réduction de l'apoptose induite par la toxicité du peptide A β , ou la modulation de l'expression de gènes majeurs de la cascade amyloïde, *BACE1* et/ou *PS1/PS2* (Florent-Bécharde *et al.*, 2007). Il est important de rappeler que la toxicité du peptide A β est liée à sa capacité à former des oligomères A β solubles. Il a été démontré *in vitro* que le DHA pourrait inhiber la formation des tri/tétramères toxiques, ainsi que leur transformation en fibrilles sur les cellules SH SY-5Y (Hossain *et al.*, 2009). De plus, il a été rapporté que le DHA augmente significativement le récepteur lié à la sortiline (SorLA/LR11), un membre de la famille de LDLR/Apolipoprotéine E, dont le déficit a été rapporté chez les patients MA et proposé comme un facteur de risque génétique de cette maladie. LR11 agit comme une protéine de tri qui contrôle le trafic de la protéine APP et la dirige vers la voie de recyclage des endosomes, entraînant ainsi une réduction de la production du peptide A β (Ma *et al.*, 2007). Le DHA stimule aussi l'expression des protéines de dégradation du peptide A β comme l'enzyme IDE de dégradation de l'insuline (Du *et al.*, 2010) ou la transthyrétine (Puskás *et al.*, 2003).

Les études chez les animaux transgéniques modèles de la MA ont mis en exergue les propriétés anti-amyloïdogènes du DHA d'origine alimentaire. En effet, des travaux menés sur la souris double-transgénique APP^{swe}/PS1 ont montré qu'un régime enrichi en AGPI-*lc n-3* peut diminuer les taux de peptide A β dans l'hippocampe (Lim *et al.*, 2005 ; Oksman *et al.*, 2006 ; Hooijmans *et al.*, 2007 & 2009 ; Perez *et al.*, 2010). Ces taux diffèrent de ceux des plaques, inchangés dans l'étude d'Oksman *et al.*, mais diminués dans celle de Lim *et al.* qui ont également montré qu'une réduction de l'apport alimentaire en AGPI-*lc n-3* (DHA et EPA) entraîne une perte des protéines synaptiques comme le récepteur au NMDA ou la protéine post-synaptique PSD-95 chez des souris modèle de la MA. Cette perte est associée à une activation des caspases et calpaïnes dans le cortex, ainsi qu'à des troubles comportementaux et cognitifs. Il est important de signaler que les troubles cognitifs et la perte des marques synaptiques observés chez

ces souris peuvent être corrigés par une alimentation riche en DHA (Calon *et al.*, 2004). Les mêmes effets neuroprotecteurs ont été observés chez des rats ayant subi une perfusion intracérébrale de peptide A β (Hashimoto *et al.*, 2002 & 2005). De façon cohérente, des souris triple transgéniques modèles de MA supplémentées en DHA voient leur production de peptide A β soluble et intraneuronale diminuer, tout comme la phosphorylation de Tau (Green *et al.*, 2007).

ii. Régulation de la plasticité synaptique et de la neurogenèse

La plasticité cérébrale est la capacité que possède le cerveau à réorganiser son réseau synaptique et neuronal pour compenser une lésion tissulaire ou pour répondre à de nouvelles conditions ou *stimuli* de l'environnement. Au cours des dernières années, de nombreux travaux se sont intéressés aux effets des AGPI-*lc n-3* sur ces processus de plasticité cérébrale. Ainsi, alors que la taille des neurones hippocampiques est réduite chez les rats carencés en DHA (Ahmad *et al.*, 2002), des études *in vitro* ont rapporté que le DHA stimule la croissance des neurites, accroît la densité des boutons synaptiques et augmente le nombre de contacts synaptiques fonctionnels des neurones hippocampiques (Calderon & Kim, 2004 ; Cao *et al.*, 2009) et des neurones corticaux (Cao *et al.*, 2005). Chez des gerbilles adultes supplémentées en DHA, une augmentation de la densité des épines dendritiques post-synaptiques a été observée dans l'hippocampe (Sakamoto *et al.*, 2007). D'autres auteurs se sont intéressés à la potentialisation à long terme (LTP), modèle expérimental d'étude de la plasticité synaptique, qui se traduit par une augmentation rapide et durable de l'amplitude des potentiels d'action post-synaptiques, suite à un court train de stimulations électriques à haute fréquence. Ce modèle de plasticité synaptique met notamment en jeu les récepteurs AMPA et NMDA. Ainsi, une supplémentation en EPA chez des rats adultes ou âgés améliore la LTP dans l'hippocampe (Kawashima *et al.*, 2010 ; Kelly *et al.*, 2011). Cao *et al.* (2009) ont également mis en évidence que le DHA favorise la synaptogenèse et l'activité glutamatergique de neurones hippocampiques en culture. Plusieurs auteurs ont montré que les AGPI-*lc n-3* induisent une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans la plasticité synaptique, telles que GAP-43 (*growth-associated protein 43*, Wu *et al.*, 2009), PSD-95 (Sakamoto *et al.*, 2007) et les sous unités des récepteurs AMPA et NMDA (Cao *et al.*, 2009).

Il est largement admis désormais que la neurogenèse, définie comme l'ensemble des processus de création d'un neurone fonctionnel du SNC à partir d'une cellule souche, pourrait jouer un rôle fonctionnel dans la plasticité cérébrale chez l'adulte (Ming & Song, 2011). Elle est confinée dans des niches localisées principalement dans le gyrus denté de l'hippocampe et la partie antérieure de la zone sous-ventriculaire. Chez le sujet âgé, on constate une diminution de la neurogenèse, phénomène qui pourrait être impliquée dans les troubles cognitifs liés au vieillissement (Drapeau & Nora Arous, 2008). Des données récentes suggèrent l'implication des AGPI *n-3* dans ce processus. Ainsi, une augmentation de la prolifération cellulaire a été mise en évidence dans l'hippocampe des souris transgéniques *fat-1*, capables de générer des AGPI *n-3* à partir de ceux de la famille *n-6* et présentant

une quantité importante d'AGPI *n*-3 dans les membranes cellulaires, notamment dans le cerveau (He *et al.*, 2009), confortant les résultats d'une étude précédente réalisée chez le homard (Beltz *et al.*, 2007). En revanche, Kawakita *et al.* (2006) ont révélé *in vitro* que le DHA diminue la prolifération cellulaire, mais stimule la différenciation neuronale *in vitro* et *in vivo*. D'autres travaux se sont intéressés aux effets des AGPI *n*-3 sur l'expression des neurotrophines, facteurs qui favorisent la neurogenèse et en particulier la survie des neurones (Lee & Son, 2009). Parmi ces neurotrophines, le niveau de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) est augmenté par les AGPI *n*-3 (Wu *et al.*, 2004 & 2008). Par contre, une déficience en ces AG induit une diminution de BDNF (Bhatia *et al.*, 2011) et de NGF (*nerve growth factor*) dans l'hippocampe de rat (Ikemoto *et al.*, 2000). De façon intéressante, un traitement par l'ALA a pu induire dans l'hippocampe de souris adultes une augmentation de la neurogenèse, en particulier de la prolifération et de la survie cellulaire ainsi que de la différenciation neuronale, corrélée avec une augmentation de l'expression de BDNF (Blondeau *et al.*, 2009).

iii. Propriétés cardiovasculaires

Un ratio *n*-6/*n*-3 élevé tel que celui qui caractérise l'alimentation occidentale semble favoriser l'incidence de nombreuses maladies chroniques, y compris les maladies cardiovasculaires qui représentent la deuxième cause de mortalité en Occident. L'alimentation joue un rôle particulièrement complexe car elle intervient à plusieurs niveaux : sur les événements eux-mêmes, sur les facteurs de risque (*e.g.* cholestérol, TG) et les marqueurs liés aux mécanismes impliqués (*e.g.* inflammation, agrégation plaquettaire, oxydation des lipoprotéines, insulino-résistance).

Les études épidémiologiques mettent en évidence des associations favorables entre la consommation de poisson et la survenue d'événements cardiovasculaires, plus marquées encore pour les accidents coronaires fatals. Ainsi, une méta-analyse des études de cohortes rapporte une diminution de 11% de la mortalité coronaire chez les sujets consommant du poisson 1 à 3 fois par mois, de 15% chez ceux qui en consomment une fois par semaine, de 23% pour 1 à 4 portions par semaine et de 38% chez ceux qui consomment du poisson 5 fois par semaine ou plus (He *et al.*, 2004b). Une autre méta-analyse montre que la consommation de poisson est associée à une diminution de l'incidence des accidents vasculaires cérébraux (He *et al.*, 2004a). Plus récemment, une méta-analyse regroupant les études de cohortes avec un suivi supérieur à 1 an a analysé les effets des AGPI-lc *n*-3 (Wang *et al.*, 2006). Les résultats montrent que la consommation de ces AG est associée à une réduction de la mortalité totale, des décès d'origine cardiaque, des taux de mort subite et peut-être d'accidents vasculaires cérébraux. Les propriétés vasculaires des AGPI-lc *n*-3, en particulier de l'EPA et du DHA, sont bien documentées. Ainsi, une méta-analyse de 36 études cliniques randomisées a montré que la consommation d'huile de poisson, à raison d'un apport de 3,7 g/j d'EPA+DHA, réduit significativement la pression artérielle systolique de 2,1 mm Hg et la pression artérielle diastolique de 1,6 mm Hg (Geleijnse *et al.*, 2002). Une autre méta-analyse plus récente met en évidence une réduction de la pression artérielle systolique de 1,3 mm Hg après ingestion d'huile de poisson (Dickinson *et al.*, 2006). D'autres propriétés vasculaires

ont également été étudiées, comme les arythmies, l'agrégation plaquettaire, l'inflammation, et l'amélioration de la réactivité vasculaire.

Les AGPI-*lc n-3* jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme lipidique. Ils diminuent les TG circulants, marqueurs du risque vasculaire global (Sacks & Katan, 2002). Une méta-analyse combinant 21 essais randomisés montre que suite à la consommation d'AGPI-*lc n-3*, la triglycéridémie est diminuée de 27 mg/dL (Balk *et al.*, 2006). Cet effet hypotriglycéridémiant est attribué à une augmentation de la lipolyse en conséquence de l'activation des récepteurs nucléaires PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*, Nagao & Yanagita, 2008), la diminution de la synthèse hépatique des TG et la baisse de la synthèse d'apolipoprotéine B conduisant à une moindre sécrétion hépatique de VLDL (Harris *et al.*, 2008). Ainsi, chez l'animal comme chez l'homme, le rôle des AGPI-*lc n-3* sur la concentration plasmatique en cholestérol total ou lié aux LDL ou aux HDL, facteurs de risque majeurs de l'athérosclérose (Sacks & Katan, 2002), reste discuté tant les résultats de la littérature sont contradictoires (Harris, 1989). L'effet de ces AG sur la cholestérolémie serait toutefois limité (Balk *et al.*, 2004). Ainsi, deux méta-analyses sur les études expérimentales de supplémentation en EPA+DHA chez l'homme ont montré qu'une dose de 3 à 4 g/j d'EPA+DHA induit une diminution des TG plasmatiques de 25 à 30%. Cette diminution est associée à un effet favorable sur le profil HDL, mais possiblement accompagnée aussi d'une augmentation de 5 et 10% du LDL-cholestérol respectivement chez les normolipidémiques et hyperlipidémiques (Harris, 1997 ; Balk *et al.*, 2006).

Le potentiel antithrombotique des AGPI-*lc n-3* a été l'un des premiers effets mis en évidence par les études sur les Esquimaux qui bénéficient d'apports alimentaires élevés en ces AG. Il peut s'expliquer par l'inhibition compétitive de l'incorporation de l'ARA effectuée par les AGPI-*lc n-3*. L'ARA et l'EPA sont les précurseurs de deux familles d'eicosanoïdes aux propriétés différentes. L'EPA entre aussi en compétition avec l'ARA pour l'enzyme clef de la synthèse des eicosanoïdes, la cyclooxygénase, et limite ainsi la synthèse d'eicosanoïdes de la série 2 (dont le thromboxane A₂) au profit de ceux de la série 3 (dont le thromboxane A₃). Or le thromboxane A₂ stimule l'agrégation plaquettaire alors que le thromboxane A₃ s'y oppose (Calder, 2004). Les propriétés antithrombotiques des AGPI-*lc n-3* restent cependant dans les limites physiologiques, n'entraînant pas de risque hémorragique à des doses quotidiennes allant jusqu'à 3 à 4 g d'EPA+DHA (Gerster, 1995).

iv. Propriétés anti-inflammatoires

Nous avons mentionné précédemment que les AGPI-*lc* peuvent être libérés des PL membranaires sous l'action des différentes isoformes de phospholipases A₂ (PLA₂). Ces AG libres sont les précurseurs de médiateurs oxygénés (Figure 36) appelés eicosanoïdes (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes, leucotriènes et lipoxines) et docosanoïdes (résolvine et neuroprotectines), respectivement synthétisés à partir d'AGPI à 20 carbones (EPA ou ARA) ou du DHA (Farooqui *et al.*, 2007). De manière générale, les médiateurs oxygénés générés à partir des AGPI *n-6* ont des propriétés opposées à ceux générés à

partir des AGPI *n-3* (Layé, 2010). Les eicosanoïdes issus de l'ARA, dérivés de la série *n-6* (prostaglandines de série 2, leukotriènes de série 4, thromboxanes de série 2), sont majoritaires et possèdent plutôt des propriétés pro-inflammatoires, athérogènes (vasoconstrictrice), pro-arythmiques et prothrombotiques (Calder, 2006). À l'inverse, les eicosanoïdes issus principalement de l'EPA, dérivé de la série *n-3* (prostaglandines de série 3, leukotriènes de série 5, thromboxanes de série 3) ont des propriétés plutôt anti-inflammatoire, anti-arythmique, vasodilatatrice et antithrombotique (Calder, 2006).

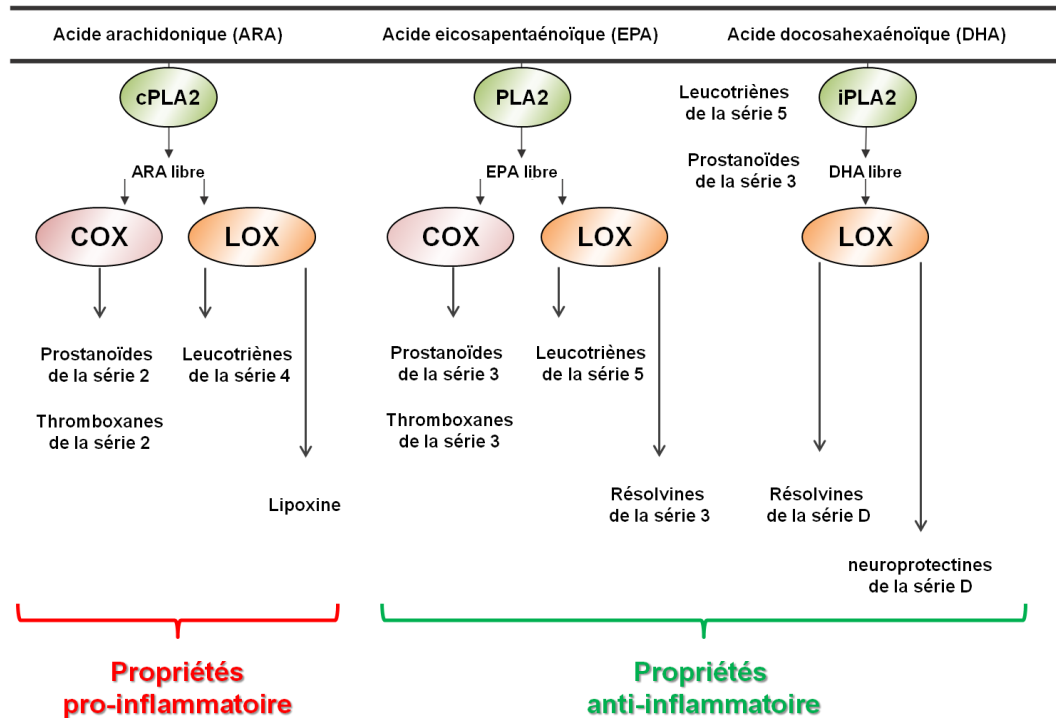


Figure 36 : Voies de synthèse des eicosanoïdes et des docosanoïdes issues des AGPI-lc (d'après Luchtman & Song, 2012)

L'oxygénation enzymatique des AGPI pour la synthèse de ces dérivés est catalysée par les lipoxygénases (5, 12, 15-LOX) ou les cyclooxygénases (COX-1 et COX-2). Les enzymes de conversion des AGPI *n-3* et *n-6* en dérivés oxygénés étant communes, les deux voies sont en compétition (Layé, 2010), à l'instar de celle existant pour la synthèse des dérivés à longue chaîne à partir des précurseurs LA et ALA. Sur la base de cette constatation, un apport alimentaire déficitaire en AGPI *n-3* augmente l'expression des protéines impliquées dans la conversion de l'ARA en molécules pro-inflammatoires, comme la PLA₂ et la COX-2 (Rapoport *et al.*, 2007). Ainsi, l'équilibre d'apport alimentaire entre les AGPI *n-6* et *n-3* conditionne la production des eicosanoïdes et des autres médiateurs en privilégiant une réponse pro ou, au contraire, anti-inflammatoire (Calder, 2006). Un nouveau groupe de médiateurs à activité anti-inflammatoire et neuroprotectrice issus de l'EPA et du DHA a été récemment identifié. Il inclut les résolvines, docosatriènes et neuroprotectines. Les résolvines de la série E, issues de l'EPA, bloquent la synthèse des cytokines et chémokines inflammatoires, tandis que celles de la série D, issues du DHA, ainsi que les docosatriènes et les neuroprotectines, possèdent des propriétés anti-

inflammatoires (Lukiw *et al.*, 2005 ; Schmitz & Ecker, 2008). Synthétisée à partir du DHA grâce à la 15-LOX, la neuroprotectine D1 (10,17S-docosatriènes, NPD1) est la première identifiée dans le cerveau, la rétine, le foie et les reins. Elle constitue un inhibiteur potentiel de l'apoptose induite par un stress oxydant important et peut réduire les processus pro-inflammatoires liés à la voie impliquant COX-2 (Bazan, 2009). De par ses propriétés, la NPD1 jouerait un rôle potentiellement bénéfique dans la MA, en induisant des voies anti-apoptotiques et neuroprotectrices, protégeant en conséquence les neurones de la toxicité du peptide A β (Lukiw *et al.*, 2005 ; Zhao *et al.*, 2011).

Plusieurs études épidémiologiques ont suggéré qu'en inhibant COX-2 qui catalyse la première étape de conversion de l'ARA en eicosanoïdes pro-inflammatoires, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), pourraient retarder l'apparition de la MA (de Craen *et al.*, 2005). En effet, certaines études attribuent aux AINS des propriétés anti-amyloïdogéniques. Cependant, les essais cliniques ayant testé l'efficacité des AINS en traitement de la MA ont montré des résultats décevants. Seul un essai a mis en évidence un ralentissement du déclin cognitif après 6 mois de traitement par indométhacine (Rogers *et al.*, 1993), les autres essais, tous de courte durée (6 à 12 mois), n'ayant montré aucun effet significatif (Scharf *et al.*, 1999 ; Aisen *et al.*, 2002 ; Reines *et al.*, 2004 ; Lyketsos *et al.*, 2007). De plus, les études épidémiologiques qui ont tenté de relier les marqueurs de l'inflammation au risque de démence ou au déclin cognitif ont montré des résultats relativement divergents (Stampfer, 2006). Toutefois, dans la *Framingham Heart study*, les niveaux de production spontanée de certaines cytokines (IL-1, TNF α) par les cellules mononucléées périphériques, probablement meilleurs marqueurs de la neuroinflammation que les cytokines circulantes, ont été associés à un risque augmenté de MA (Tan *et al.*, 2007). Les médiateurs aux propriétés anti-inflammatoires produits à partir des AGPI-*n-3* pourraient contribuer à limiter la neurodégénérescence, mais les quelques essais cliniques qui ont évalué l'impact d'une supplémentation en DHA \pm EPA sur l'évolution des marqueurs inflammatoires périphériques dans différentes pathologies ont montré des résultats inconstants (Cunnane *et al.*, 2009). Dans l'essai clinique OmegAD, une supplémentation en EPA+DHA pendant 6 mois chez des patients souffrant d'une MA légère à modérée a été associée à une diminution de la libération d'IL-1 et d'IL-6 par les cellules mononucléées après stimulation *ex vivo* par des lipopolysaccharides (Freund-Levi *et al.*, 2008), mais les concentrations des biomarqueurs de l'inflammation sont restées inchangées dans le LCR et le plasma (Freund-Levi *et al.*, 2009). Dans l'étude MEMO (*Mental Health in elderly Maintained with n-3*), une supplémentation en EPA+DHA (1,8 g/j) administrée durant 26 semaines à des sujets âgés sans déficit cognitif a été associée à l'expression diminuée de plusieurs gènes des cellules mononucléées périphériques impliqués dans les mécanismes inflammatoires et l'athérogenèse (Bouwens *et al.*, 2009).

v. Propriétés antioxydantes

Comme nous l'avons déjà mentionné, le cerveau est particulièrement susceptible au stress oxydant, qui plus est lorsque celui-ci augmente avec l'âge. Cette sensibilité résulte de la richesse du cerveau en

AGPI-1c, ARA et DHA, à une production naturellement élevée de radicaux libres liée à un métabolisme énergétique très actif, et à un niveau relativement modeste de défenses antioxydantes (Slivka *et al.*, 1987 ; Reiter, 1995 ; Floyd & Hensley, 2002).

Plusieurs résultats issus de travaux menés *in vitro* ou *in vivo* suggèrent que le DHA pourrait disposer de propriétés antioxydantes en augmentant l'activité de la glutathion réductase et en diminuant la formation des ERO, la peroxydation lipidique et l'accumulation de protéines oxydées (Calon & Cole, 2007). Ainsi, il a été montré récemment qu'une supplémentation en AGPI-1c *n*-3 pendant 5 semaines augmente l'activité de la superoxyde dismutase mitochondriale dans le cervelet de jeunes rats, ce qui diminue en conséquence la formation des ERO (Garrel *et al.*, 2012). Les études évaluant chez l'homme l'impact d'une supplémentation en EPA et DHA sur le stress oxydant ont mené à des résultats contradictoires, suggérant qu'une supplémentation à faible dose pourrait protéger du stress oxydant, mais favoriser au contraire la peroxydation lipidique à haute dose (Cunnane *et al.*, 2009). Guillot *et al.* (2009) ont pu associer une supplémentation en DHA à faible dose (200 mg/j) à des effets antioxydants, mais constater une amplification de la peroxydation lipidique à des doses élevées (>1 g/j). L'effet antioxydant du DHA pourrait aussi être expliqué par la production de NPD1 après oxygénation enzymatique du DHA libre, éventuellement hydrolysé au préalable par une PLA₂ à partir des PL membranaires (Lukiw & Bazan, 2008). Cependant, à fortes doses, le DHA pourrait induire et subir une oxydation par voie non enzymatique, générant ainsi des neuroprostanes (F4, D4, E4, A4, J4) associés à la production d'ERO (Montine & Morrow, 2005 ; Lukiw & Bazan, 2008). Ces données suggèrent qu'une supplémentation efficace en DHA doit nécessiter une optimisation fine des doses susceptibles d'induire des bénéfices sur la santé, association éventuellement le DHA à d'autres composés doués de propriétés antioxydantes, tels que les polyphénols (Florent *et al.*, 2006 ; Florent-Bécharde *et al.*, 2007).

vi. Régulation génique de la neuroinflammation et de la plasticité synaptique

L'effet direct des AGPI-1c sur la régulation de l'expression génique pourrait être l'une des clés pour comprendre les mécanismes d'action de ces AG dans le SNC. En effet, plusieurs facteurs de transcription activés par les AGPI-1c *n*-3 ou leurs dérivés ont été identifiés dans différents tissus. Cette activation mène globalement à une inhibition des voies de signalisation impliquées dans l'inflammation, l'apoptose, la lipogenèse, le stress oxydant et la plasticité synaptique (Schmitz & Ecker, 2008).

• **NF-κB**

Les AGPI-1c *n*-3 et leurs dérivés inhibent le facteur de transcription NF-κB (Figure 37), impliqué dans de nombreuses voies de signalisation de l'inflammation en contrôlant notamment la libération de diverses cytokines, chimiokines, protéines d'adhésion cellulaire et enzymes inductibles comme iNOS et COX-2 (Schmitz & Ecker, 2008).

- **PPAR, RXR et RAR**

Les AGPI sont des ligands naturels des PPAR (Pégorier *et al.*, 2004), facteurs de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires, qui contrôlent l'expression de plusieurs gènes de l'inflammation ou du métabolisme des lipides. Les récepteurs nucléaires se caractérisent par leur affinité très spécifique pour certains ligands. Lorsqu'ils sont activés, les PPAR (peroxysome proliferator-activated receptor) forment avec RXR (*Retinoid X Receptor*) des hétérodimères qui modulent l'expression de gènes cibles en se fixant sur leurs régions régulatrices. L'activation des PPAR est en partie réalisée par les AGPI *n-3* qui ont un potentiel d'activation des PPAR plus élevé que les *n-6*. Les PPAR sont aussi activés par les eicosanoïdes dérivés des AGPI *n-3* et dont le potentiel d'activation est spécialement élevé (Figure 37). Les AGPI *n-3* pouvant se lier aux hétérodimères PPAR–RXR avec une haute affinité, leur apport est donc susceptible de moduler l'expression des gènes ciblés par les PPAR, notamment ceux impliqués dans la neuro-inflammation (Schmitz & Ecker, 2008). Les RXR peuvent aussi former des dimères avec d'autres récepteurs nucléaires comme les RAR (*Retinoic Acid Receptor*), tous deux étant fortement exprimés dans l'hippocampe et jouant alors un rôle essentiel dans la neurogenèse, la différenciation neuronale et la plasticité cérébrale lors de l'embryogenèse (Innis, 2007). Plusieurs études chez l'animal montrent que le DHA se fixe spécifiquement sur le RXR, entraînant son activation et la modulation de gènes habituellement régulés par l'acide rétinoïque et impliqués dans le maintien de la plasticité synaptique et des performances mnésiques (Cunnane *et al.*, 2009).

- **SREPB-1c et LXR**

Les AGPI inhibent l'activité ou la synthèse de SREBP-1c (*Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c*), facteur de transcription exprimé dans la plupart des tissus et impliqué dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse (Schmitz & Ecker, 2008). Les AGPI agissent probablement en inhibant le LXR (*Liver X Receptor*), activateur majeur de SREBP-1c et impliqué dans la régulation du métabolisme du cholestérol et des lipides, ainsi que de la réponse inflammatoire dans les macrophages (Zelcer & Tontonoz, 2006). L'activation des PPAR et l'inhibition de SREPB-1c conduiraient ainsi les AGPI *n-3* à augmenter la dégradation des lipides et à diminuer la synthèse lipidique (Figure 37). Ce mécanisme permettrait d'expliquer les propriétés hypotriglycéridémiantes des AGPI-*n-3* (Jump *et al.*, 2005 ; Davidson, 2006).

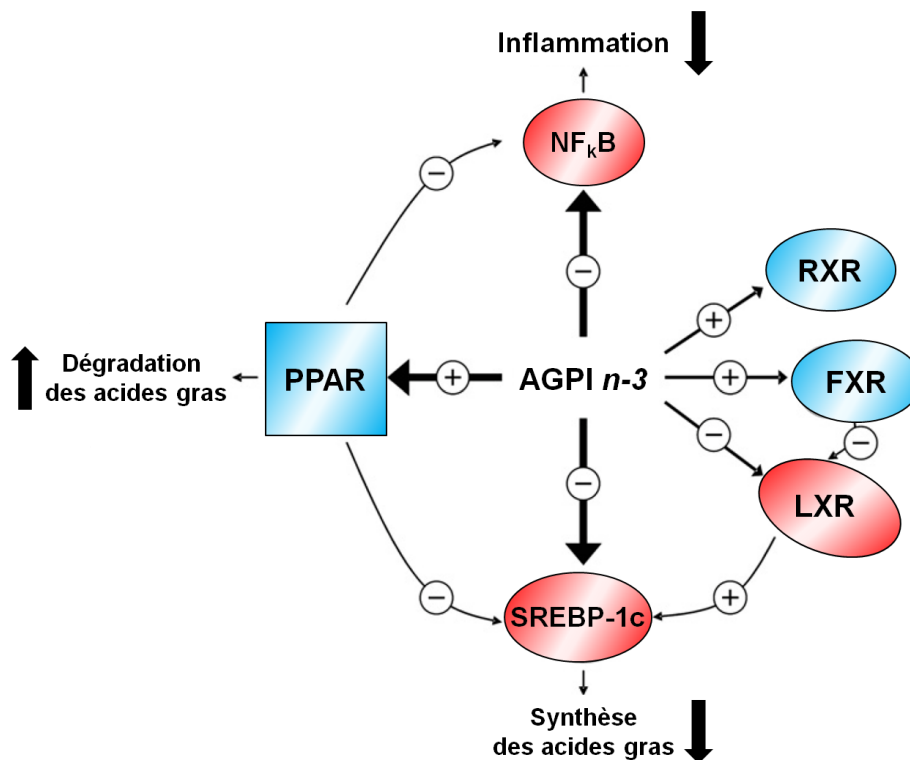


Figure 37 : Modulation de l'expression des gènes par les AGPI *n*-3
(d'après Schmitz & Ecker, 2008)

Plusieurs études ont visé à caractériser les effets des AGPI sur la régulation de l'expression génique dans le SNC (Berger *et al.*, 2002 ; Kitajka *et al.*, 2002 ; Yamashima, 2012). Les gènes dont l'expression est modifiée par les apports alimentaires en AGPI *n*-3 participent à la plasticité synaptique, à la signalisation cellulaire, à la formation des canaux ioniques ou au métabolisme cérébral (Kitajka *et al.*, 2002). Ainsi, le DHA semble réguler la synthèse de BDNF et contribuer à la plasticité cérébrale en activant le facteur de transcription CREB (*cAMP response element-binding protein*) et la voie des MAP kinases (Rao *et al.*, 2007 ; Yamashima, 2012). Il module également la voie de signalisation de la phosphatidylinositol 3-kinase ou PI3K (Calon *et al.*, 2004) et de la protéine kinase B (PKB ou Akt, Akbar *et al.*, 2005). Enfin, les AGPI-*lc n*-3 et leurs dérivés pourraient stimuler la transcription de gènes anti-apoptotiques comme ceux de la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*, Lukiw *et al.*, 2005).

- **Neurotransmetteurs**

Les effets des AGPI-*lc n*-3 sur la fonction, l'intégrité et la neurochimie synaptique restent encore en débat, principalement en raison du fait que les mécanismes impliqués sont encore insuffisamment connus. Il est très vraisemblable que ces AGPI activent de façon simultanée et complexe différents processus synergiques dont l'impact sur la structure et la fonction des membranes neuronales, l'expression des gènes et le métabolisme des eicosanoïdes/docosanoïdes (Luchtman & Song, 2012). Quel que soit le processus engagé, il en résulte nécessairement des changements biochimiques qui peuvent affecter la membrane neuronale et moduler ses nombreuses fonctionnalités, dont le maintien des différents types de récepteurs, le contrôle de la structure et de l'activité des canaux ioniques, la

conduction du potentiel d'action au long de l'axone et les activités synaptiques. Le DHA pourrait influencer plusieurs protéines synaptiques, comme la PSD-95 et la drébrine, une protéine régulatrice d'épine dendritique (Calon *et al.*, 2004). Des études *in vitro* ont montré la capacité du DHA à moduler la transmission d'informations électriques entre les neurones. Par exemple, l'application extracellulaire de DHA influence l'activité des récepteurs ioniques glutamatergiques NMDA (Nishikawa *et al.*, 1994) et GABA (Søgaard *et al.*, 2006), réduit le mécanisme de dépression synaptique à long terme (LTD) (Young *et al.*, 1998) et module l'activité de plusieurs types de canaux ioniques (potassiques, sodiques et calciques) déterminant l'activité du neurone et de ses synapses (Poling *et al.*, 1996 ; Vreugdenhil *et al.*, 1996 ; Seebunkert & Lynch, 2002).

Nous avons déjà indiqué que le niveau de cholestérol dans la membrane neuronale a tendance à s'élever lors du vieillissement, rigidifiant ainsi la membrane neuronale, ce qui peut perturber l'insertion rapide et le regroupement de différents récepteurs au sein de plateformes de signalisation fonctionnelles. Puisque la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique exige la fusion de vésicules avec la membrane synaptique, la baisse de la fluidité membranaire peut aussi nuire à la transmission synaptique (Martin *et al.*, 2002). Ce phénomène pourrait être inversé par l'incorporation dans la bicouche lipidique d'AGPI-*lc n-3* comme le DHA, doués pour favoriser la fluidité des membranes neuronales, le transfert de l'influx nerveux et les échanges ioniques transmembranaires, la formation et la fusion des vésicules et le transport des récepteurs au glutamate de type AMPA, très dynamiques et dont la distribution intracellulaire dépend des propriétés de leur environnement membranaire (Yersin *et al.*, 2007).

Le rôle des AGPI-*lc n-3* dans le stockage et la libération présynaptique des neurotransmetteurs, notamment des systèmes monoaminergiques et dopaminergiques, a fait l'objet d'une attention toute particulière (Aïd *et al.*, 2005 ; Chalon, 2006). Le modèle de rat carencé en AGPI *n-3* a permis de mettre en évidence la perturbation de ces processus concernant plusieurs neurotransmetteurs, avec une augmentation de la libération spontanée, *i.e.* en l'absence de stimulation nerveuse, dans l'espace synaptique d'acétylcholine (Aïd *et al.*, 2003) et de sérotonine (Kodas *et al.*, 2004) dans l'hippocampe et de dopamine dans le noyau accumbens (Zimmer *et al.*, 2000). En revanche, la libération chimiquement induite de ces neurotransmetteurs est significativement réduite, comparée à celle mesurée chez des rats témoins non carencés en AGPI *n-3*, conduisant les auteurs à penser que la fuite des neurotransmetteurs dans la fente synaptique réduirait les stocks contenus dans les vésicules (Alessandri *et al.*, 2004). Lors de la stimulation nerveuse, générée par exemple en situation d'apprentissage, la quantité de neurotransmetteur libérée serait alors réduite et conduirait ainsi à une transmission synaptique moins efficace de l'influx nerveux. Ces processus pourraient contribuer à expliquer les perturbations comportementales observées chez les animaux carencés en AGPI *n-3* (Fedorova & Salem, 2006). Il convient d'ajouter qu'une supplémentation en DHA supprime les perturbations de la transmission d'acétylcholine induites par la carence (Aïd *et al.*, 2005). Mais les effets d'une application du DHA ne se limitent pas qu'à des changements électriques. Ajouté au milieu de culture neuronale, l'AG promeut

aussi le développement neuritique, accroît la densité des boutons et des épines synaptiques, et augmente le nombre de contacts synaptiques fonctionnels des neurones hippocampiques de souris et chez la gerbille (Sakamoto *et al.*, 2007 ; Cao *et al.*, 2009). Il est tout particulièrement intéressant de préciser ici que l'extension neuritique a été observée sur des neurones isolés de cerveau de souris jeune et adulte, ce qui suggère que la régulation du DHA sur l'arborisation neuronale peut opérer à différents âges, y compris hors des périodes de développement (Robson *et al.*, 2010).

vii. Contrôle de l'utilisation cérébrale du glucose

Le cerveau ne représente que 2% du poids du corps chez l'adulte, mais il consomme 20% de l'oxygène et 25% du glucose et est donc le plus gros consommateur d'énergie. L'apport des nutriments au cerveau est réalisé à travers la BHE formée de cellules endothéliales qui tapissent les microvaisseaux cérébraux. Ces cellules se distinguent des cellules endothéliales périphériques par la présence de jonctions serrées qui limitent le flux paracellulaire de molécules hydrophiles. À l'inverse, les substances lipophiles de petite taille (O₂, CO₂) diffusent librement à travers la membrane plasmique selon un gradient de concentration. Les nutriments comme le glucose et les acides aminés pénètrent dans le cerveau par des transporteurs. Bien que la teneur en AGPI-*lc n-3* soit faible dans les cellules endothéliales (6% DHA, *vs.* 23% dans le cortex), une baisse de la teneur en DHA à 3%, par exemple en conséquence d'une carence alimentaire en AGPI *n-3*, représente une modification d'une importance suffisante pour altérer certaines fonctions de la BHE. C'est notamment le cas du transport du glucose circulant vers le cerveau (Pifferi *et al.*, 2005), altéré par la baisse significative de l'expression d'un transporteur membranaire spécifique chez les rats carencés en DHA (Pifferi *et al.*, 2007). Chez ces mêmes animaux, une réduction de la consommation de glucose et de la production d'énergie par la mitochondrie a été observée dans différentes structures cérébrales, permettant de conclure à une diminution de l'activité neuronale (Ximenes da Silva *et al.*, 2002). Le DHA semble donc important pour assurer une absorption normale du glucose permettant d'approvisionner normalement le cerveau et d'optimiser ainsi les fonctions neuronales. Or, une baisse de la consommation du glucose est généralement observée dans des régions corticales spécifiques au cours du vieillissement normal ou pathologique (Kalpouzos *et al.*, 2009), ainsi que chez les sujets porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ de l'ApoE (Reiman *et al.*, 2004), et ce bien avant l'apparition des troubles cognitifs. L'une des hypothèses émergentes est donc que le DHA pourrait prévenir le vieillissement cérébral en luttant contre l'hypométabolisme cérébral du glucose observé au cours du vieillissement normal et au cours de la MA. Cette protection pourrait être étendue par une supplémentation en ALA, un AG dont la capacité à favoriser la production de corps cétoniques contribuerait à contourner le problème que posent les perturbations de l'approvisionnement en glucose du cerveau des personnes âgées (Freemantle *et al.*, 2006).

g. AGPI n-3 et déclin cognitif : études épidémiologiques

i. Statut sanguin en AGPI n-3

Dans l'ensemble, la littérature suggère que de faibles taux sanguins de DHA pourraient être un facteur de risque de déclin cognitif ou de développement d'une MA. Dans l'étude transversale de Conquer *et al.* (2000), les taux d'AGPI *n-3* plasmatiques sont inversement corrélés à la présence de troubles cognitifs. Cette équipe a étudié la composition en AG des PL plasmatiques (PC, PE et fractions lysophosphatidylcholine) de sujets normaux (n=19 ; âge moyen : 77 ans) ou atteints de MA (n=19 ; âge moyen : 83 ans), d'autres types de démence (n=10 ; âge moyen : 79 ans) et d'altération cognitive non démentielle (n=36 ; âge moyen : 83 ans). La quantité d'AGPI-lc *n-3* totaux dans les PL plasmatiques ainsi que le ratio *n-3/n-6* étaient significativement inférieurs chez les sujets présentant des troubles cognitifs par rapport aux témoins. Une telle association a été retrouvée par d'autres équipes. Des taux significativement plus faibles d'AGPI-lc *n-3* ont été retrouvés chez des sujets MA (Tully *et al.*, 2003), et il a été rapporté que les taux de cholestéryl ester-DHA sont réduits progressivement en relation avec la sévérité de la démence. De plus, l'étude italienne InCHIANT menée chez 935 sujets de plus de 65 ans a montré que la présence d'une démence était associée à des proportions d'AGS plus élevées et d'AGPI *n-3* plus faibles (Cherubini *et al.*, 2007). D'autres travaux plus récents ont confirmé cette corrélation (Lopez *et al.*, 2011 ; Tan *et al.*, 2012), mais quelques études n'ont pas mis en évidence de différence du statut sanguin en APGI *n-3* selon le niveau de performances cognitives ou le statut démentiel (Manzato *et al.*, 2003 ; Boston *et al.*, 2004). Le travail de Dullemeijer *et al.*, (2007) offre l'intérêt de présenter en parallèle les résultats d'une analyse transversale sur 807 sujets et d'une analyse longitudinale pendant 3 ans sur 404 sujets, tous âgés de 50 à 70 ans et issus de l'étude FACIT (*Folic Acid and Carotid Intima-Media Thickness study*). Alors que les auteurs ne mettaient en évidence aucune association entre les proportions plasmatiques des AGPI *n-3* et les performances cognitives dans l'étude transversale, une association était observée sur les performances aux tests de vitesse de traitement dans l'étude longitudinale. D'autres études longitudinales ont mis en évidence des relations inverses entre AGPI *n-3* totaux et l'évolution de performances cognitives (Beydoun *et al.*, 2007 ; Whalley *et al.*, 2008). Ainsi, dans l'étude EVA du vieillissement artériel chez les sujets âgés de 63 à 74 ans et suivis 4 ans, le déclin cognitif a été corrélé à des taux élevés d'AGPI *n-6* dans les membranes érythrocytaires, alors que les taux élevés d'AGPI *n-3* totaux ont été eux associés à une réduction du risque de déclin cognitif (Heude *et al.*, 2003). L'étude qui a présenté le suivi le plus long (9,1 ans en moyenne) a montré que les sujets dont la teneur de DHA dans les PC plasmatiques était au niveau du quartile supérieur avaient un risque de démence, toutes causes confondues, diminué de 47% par rapport aux sujets ayant des valeurs du niveau des autres quartiles (Schaefer *et al.*, 2006). Une seule étude, la CSHA (*Canadian Study of Health and Aging*), a suggéré une association délétère entre les teneurs en AGPI totaux, AGPI *n-3* et DHA dans les PL plasmatiques et le risque de démence toutes causes, ainsi qu'une association délétère entre les taux d'EPA et la probabilité de déficience cognitive sans démence (Laurin *et al.*, 2003). Il s'agissait là d'une étude cas-témoin dont l'effectif était très faible (n=77), mais les mêmes auteurs ont plus

récemment rapporté une absence d'association entre les taux d'AGPI *n-3*, d'EPA ou de DHA dans la membrane érythrocytaire et le risque de démence ou de MA (Kröger *et al.*, 2009).

ii. Consommation alimentaire en AGPI *n-3* et déclin cognitif

• **Études d'observation**

Quelques études transversales ont mis en évidence une relation entre la faible consommation de poisson ou d'AGPI *n-3* et l'altération des performances cognitives chez des adultes (Kalmijn *et al.*, 2004) ou des sujets âgés (Barberger-Gateau *et al.*, 2005 ; Nurk *et al.*, 2007). Une association protectrice entre consommation de poisson et prévalence de la démence a aussi été reportée dans une étude menée sur 14.960 sujets dans 7 pays en voie de développement (Albanese *et al.*, 2009). Plusieurs études longitudinales rapportent en effet une prévalence moindre de la MA dans les populations dont le régime alimentaire est riche en AGPI *n-3*. L'étude *Rotterdam* a été la première à s'intéresser à l'association entre consommation de poisson et risque de démence, MA et démence vasculaire (Kalmijn *et al.*, 1997). Alors qu'une relation protectrice a été mise en évidence entre consommation de poisson et risque de démence ou de MA après 2 ans de suivi, cette association n'a été confirmée ni après 6 ans (Engelhart *et al.*, 2002), ni après 14 ans de suivi (Devore *et al.*, 2009). Par contre, l'étude PAQUID a mis en évidence une corrélation négative entre la fréquence de consommation de poisson et le risque de développer une démence dans les 7 ans qui suivent (Barberger-Gateau *et al.*, 2002). Les données obtenues lors de l'étude CHAP (*Chicago Health and Aging Project*) confirment cette association, puisque là encore, la consommation de poisson a été associée à un ralentissement du déclin cognitif et un risque moindre de développer une démence de type Alzheimer (Morris *et al.*, 2003a, 2003b & 2005). Une relation similaire entre AGPI *n-3* et risque de déclin cognitif, particulièrement chez des sujets hypertendus, a été identifiée au sein d'un groupe de 7.814 personnes âgées de 50 à 65 ans issues de l'étude ARCS (*Atherosclerosis Risk in Communities Study*, Beydoun *et al.*, 2008). De la même manière, les résultats de la cohorte des Trois Cités montrent que la consommation fréquente de fruits, légumes, poissons et huiles riches en AGPI *n-3* pourrait réduire le risque de démence et de MA, alors que la consommation des AGPI *n-6* est associée elle à un risque accru de démence lorsqu'il n'est pas compensé par des AGPI *n-3* (Barberger-Gateau *et al.*, 2007). Enfin, l'étude E3N (Étude Épidémiologique de femmes de la mutuelle générale de l'Éducation Nationale) a observé une association inverse entre la consommation de poisson à l'âge moyen de la vie et la probabilité de déclin cognitif récent chez des sujets âgés de 76 à 82 ans (Vercambre *et al.*, 2009). L'ensemble de ces données atteste donc de l'importance des AGPI *n-3* pour le maintien des fonctions mnésiques au cours du vieillissement cérébral.

• **Études d'intervention**

Alors que les études animales et la majorité des études épidémiologiques suggèrent un effet protecteur des AGPI-*lc n-3* sur le risque de MA ou le déclin cognitif, des études d'intervention ont évalué l'efficacité d'une supplémentation en ces AG en prévention du déclin cognitif. Dans un essai

conduit aux Pays-Bas (van de Rest *et al.*, 2008), 302 sujets, âgés de 65 ans ou plus, ne présentant pas d'altération des performances cognitives, étaient répartis en double aveugle dans trois groupes pour un traitement de 26 semaines leur administrant un placebo ou une dose de 400 mg/j ou 1.800 mg/j d'un mélange EPA+DHA. Aucune différence significative sur l'évolution des performances cognitives n'était observée dans les deux groupes traités par EPA+DHA par rapport au groupe placebo. Néanmoins, une amélioration des performances cognitives dans le domaine de l'attention était observée chez les sujets porteurs d'au moins un allèle $\epsilon 4$ de l'ApoE dans les deux groupes supplémentés en AGPI-lc *n*-3. Ce résultat suggère que ces AG pourraient être bénéfiques uniquement chez les sujets porteurs du facteur de susceptibilité génétique pour la MA, mais cette étude s'appuyait sur un protocole discutable : les sujets présentaient au départ des performances cognitives normales et ils auraient donc dû être suivis sur une période plus longue, donnant la possibilité d'observer un déclin cognitif notable et comparativement alors un éventuel bénéfice clinique des traitements sur la cognition. Une autre étude exploratoire réalisée par Johnson *et al.* (2008) chez 49 femmes sans troubles cognitifs, recevant de façon randomisée pendant 4 mois un placebo (n=10) ou une supplémentation en DHA (800 mg/j, n=14), en lutéine (un antioxydant, n=11), ou en DHA+lutéine (n=14). Les trois groupes supplémentés montraient une amélioration significative des performances aux tests de fluence verbale par rapport au groupe placebo, les sujets ayant bénéficié de l'association DHA+lutéine montrant aussi une amélioration des performances aux tests de mémoire et d'apprentissage.

D'autres études d'intervention ont évalué l'efficacité des AGPI-lc *n*-3 en prévention de la démence, ou pour retarder l'évolution des symptômes cognitifs chez des sujets souffrant d'une démence ou une MA à différents stades. Dans l'étude OmegAD, seul le sous-groupe de sujets présentant la fonction cognitive la mieux préservée (score MMSE > 27) a présenté un ralentissement du déclin cognitif en conséquence d'une supplémentation en EPA (0,6 g/j) + DHA (1,7 g/j) après 6 mois (Freund-Levi *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont été observés dans deux autres études d'intervention. Une petite étude a montré une amélioration des performances aux tests de mémoire immédiate et d'attention, ainsi qu'un effet favorable sur la cognition chez les 12 patients avec MCI supplémentés durant 3 mois en ARA+DHA (240 mg/j mais en proportions respectives non précisées), mais pas chez les patients avec MCI recevant le placebo, ni chez les patients avec MA (Kotani *et al.*, 2006). Dans une étude pilote, 23 patients avec une MA et 23 patients MCI étaient répartis aléatoirement pour recevoir pendant 6 mois un placebo ou 1,8 g/j d'un mélange à 60/40% EPA+DHA (Chiu *et al.*, 2008). Le groupe supplémenté en AGPI-lc *n*-3 montrait une amélioration significative des performances cognitives par rapport au groupe placebo, mais uniquement chez les sujets MCI.

Les résultats de ces études suggèrent que les AGPI *n*-3 pourraient jouer un rôle dans la prévention de la MA, mais ne semblent pas offrir de perspective pour traiter ou améliorer une MA déjà installée. En revanche, les AGPI-lc *n*-3 ne pourraient exercer des effets neuroprotecteurs perceptibles au niveau clinique que lors des stades très précoces, prodromal et débutant, de la maladie. Leurs bénéfices ne

pourraient donc s'exprimer que dans une approche de prévention, avant que les lésions neurologiques et les troubles cognitifs associés ne soient trop avancés pour pouvoir être inversés par des facteurs nutritionnels. Il convient de remarquer que la diversité des doses administrées démontre l'absence de consensus sur la nature de l'apport en AGPI *n-3* à privilégier, ainsi que sur la dose efficace ou recommandée et sur la durée du suivi à mener pour pouvoir observer un bénéfice clinique. Enfin, l'association des AGPI-*lc n-3* à d'autres composés comme des antioxydants mériterait certainement plus d'études pour en évaluer l'intérêt préventif réel et en préciser les conditions.

3. Les polyphénols, des molécules naturelles d'intérêt thérapeutique

a. Définitions

Les polyphénols constituent une famille de molécules phénoliques très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ce sont des métabolites secondaires essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement. Ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV,...) et contribuent à la qualité organoleptique des aliments de nature végétale (couleur, astringence, arôme, amertume,...), ce qui leur permet de jouer un rôle déterminant dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (Harborne & Williams, 2000 ; Manach *et al.*, 2004). La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques, la tyrosine et la phénylalanine. Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon l'espèce, l'organe, le tissu ou le stade de développement. Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples, comme les acides phénoliques, vers les plus hautement polymérisées comme les tanins condensés. Avec plus de 8.000 structures phénoliques identifiées, les polyphénols sont répartis de façon ubiquitaire dans les fruits et légumes qui en constituent les principales sources alimentaires. Leurs concentrations sont particulièrement élevées dans certains produits ou extraits comme les huiles, le vin, le thé ou les jus, avec de fortes variations selon les espèces végétales utilisées (Scalbert & Williamson, 2000 ; Manach *et al.*, 2004).

Les composés phénoliques sont l'objet d'une littérature de plus en plus abondante. En effet, leur grande variété de structure et les nombreuses propriétés biologiques associées en font des molécules aux nombreuses applications, réelles ou potentielles, dans les domaines pharmaceutique, cosmétologique et agroalimentaire (Ajila *et al.*, 2011). L'étiologie complexe de la MA suggère que des molécules comme les polyphénols pourraient présenter un intérêt thérapeutique et préventif. Ceci a été confirmé par plusieurs études cliniques et épidémiologiques, ainsi que de nombreuses études *in vivo* et *in vitro*, indiquant que ces molécules peuvent en effet apporter des bénéfices en améliorant les pertes cognitives liées à cette pathologie (Ramassamy, 2006 ; Rossi *et al.*, 2008).

b. Structure et classification

Les polyphénols peuvent être regroupés en de nombreuses classes suivant la complexité du squelette de base (noyaux en C6), le degré de modification de ce squelette (oxydation, hydroxylation,...) et les molécules auxquelles ils sont associés (glucides, lipides, protéines ou autres métabolites). Les formes les plus simples sont représentées par deux principaux groupes dont dérivent de nombreux composés : les non flavonoïdes (acides phénoliques) et les flavonoïdes (Figure 38). Les formes complexes, comprenant entre autres les tannins et les lignines, sont quant à elles pour la plupart issues de la condensation de certaines formes simples.

i. Les non flavonoïdes (acides phénoliques)

Deux classes peuvent être distinguées parmi les non flavonoïdes selon qu'ils dérivent de l'acide benzoïque (acides hydroxybenzoïques) ou de l'acide cinnamique (acides hydroxycinnamiques).

• Les acides hydroxybenzoïques

Présents dans peu de végétaux de l'alimentation courante, ils sont peu étudiés. Ils ont une formule de base de type C6-C1 (Figure 39a). Dérivés de l'acide benzoïque, leur diversité structurale est due aux méthoxylations et/ou hydroxylations du noyau aromatique en diverses positions (1, 2, 3 et 4), donnant ainsi les acides 4-hydroxybenzoïque, 3-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique et gentisique (Tomás-Barberán & Clifford, 2000). Ils sont le plus fréquemment présents dans les fruits et légumes sous forme de conjugués (esters ou glycosides).

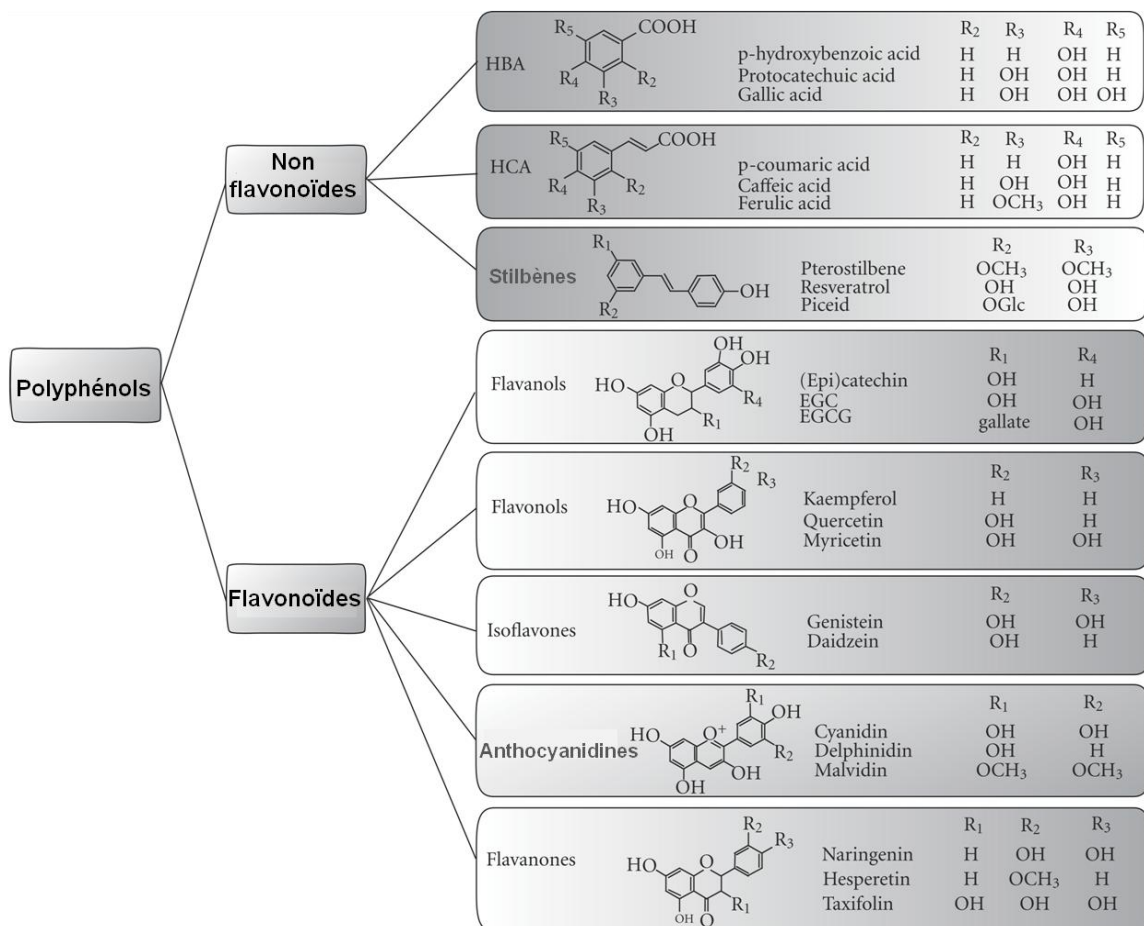


Figure 38 : Classification des polyphénols (d'après Vauzour, 2012)

HBA : acides hydroxybenzoïques, HCA : acides hydroxycinnamiques

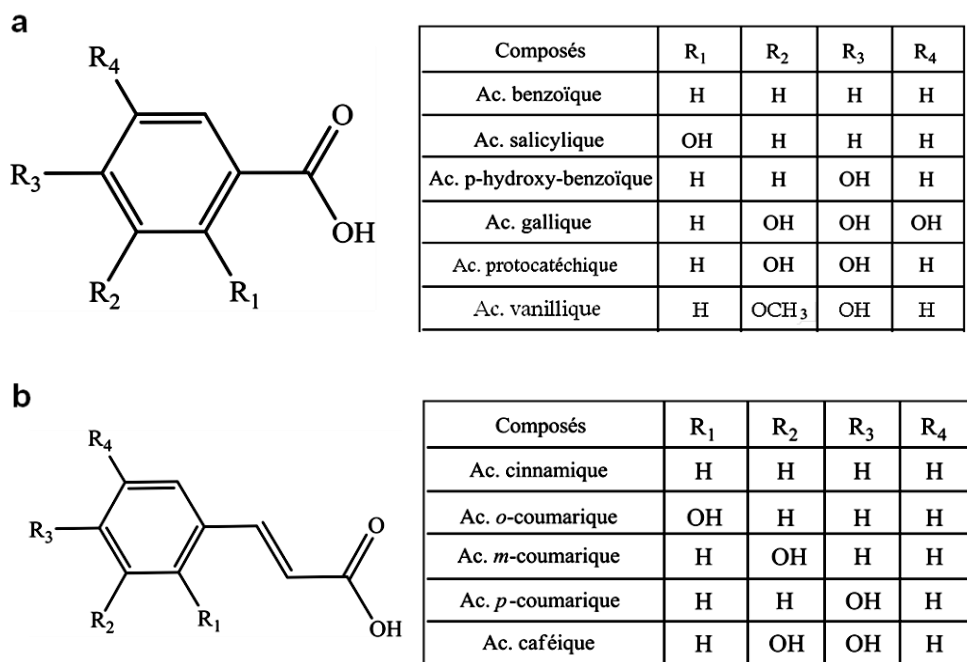


Figure 39 : Principales classes de l'acide phénolique

Formule générale et dérivés de l'acide benzoïque (a) ou de l'acide cinnamique (b)

- **Les acides hydroxycinnamiques**

Très répandus dans le règne végétal, ces composés ont une formule de base de type C6-C3 (Figure 39b) et leur diversité est également due à la variabilité des hydroxylations du noyau aromatique. Le composé le plus courant est l'acide caféique qui représente à lui seul 75 à 100% des acides hydroxycinnamiques totaux de la plupart des fruits. Les acides férulique, sinapique et 4-coumarique sont également répandus dans les aliments. Les acides hydroxycinnamiques sont rarement présents sous forme libre et sont retrouvés essentiellement sous formes conjuguées. Il s'agit de dérivés glycosylés ou d'esters avec les acides quinique, tartrique ou shikimique (Manach *et al.*, 2004).

- ii. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants de notre alimentation et plus de 4.000 composés ont pu être identifiés (D'Archivio *et al.*, 2007). On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes. Par définition, les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure C6-C3-C6 du diphenylpropane (Figure 40). Les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (de Rijke *et al.*, 2006). Les flavonoïdes sont subdivisés en six grandes sous-classes selon la structure de l'hétérocycle C : flavones, isoflavones, flavonols, flavanones, flavanols et anthocyanes. On trouve aussi des composés plus minoritaires, les chalcones et dihydrochalcones (Crozier *et al.*, 2009). Il existe dans chaque sous-classe de nombreux composés selon les substitutions des cycles aromatiques. La plupart des flavonoïdes sont glycosylés, ce qui augmente leur solubilité dans l'eau (Crozier *et al.*, 2009).

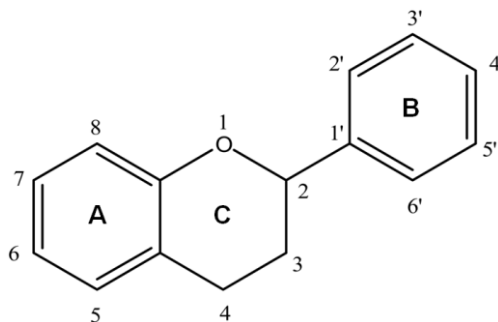


Figure 40 : Structure de base des flavonoïdes

- c. **Biodisponibilité**

Les effets bénéfiques des polyphénols dépendent essentiellement de leur biodisponibilité, c'est-à-dire des étapes d'absorption, de métabolisation, de stockage et d'excrétion de ce composé (Figure 41). Il est important de savoir que les polyphénols, largement répandus dans l'alimentation humaine, ne sont pas nécessairement les plus actifs dans l'organisme, soit parce qu'ils ont une faible activité intrinsèque ou parce qu'ils sont mal absorbés, rapidement éliminés ou efficacement biotransformés. D'ailleurs, les métabolites résultant de la digestion ou de l'activité hépatique et qui sont retrouvés dans le sang et les

organes cibles peuvent être porteurs d'activités biologiques différentes de celles des substances natives. Une connaissance approfondie des paramètres sur lesquels repose la biodisponibilité des polyphénols est donc essentielle pour élucider leurs effets sur la santé.

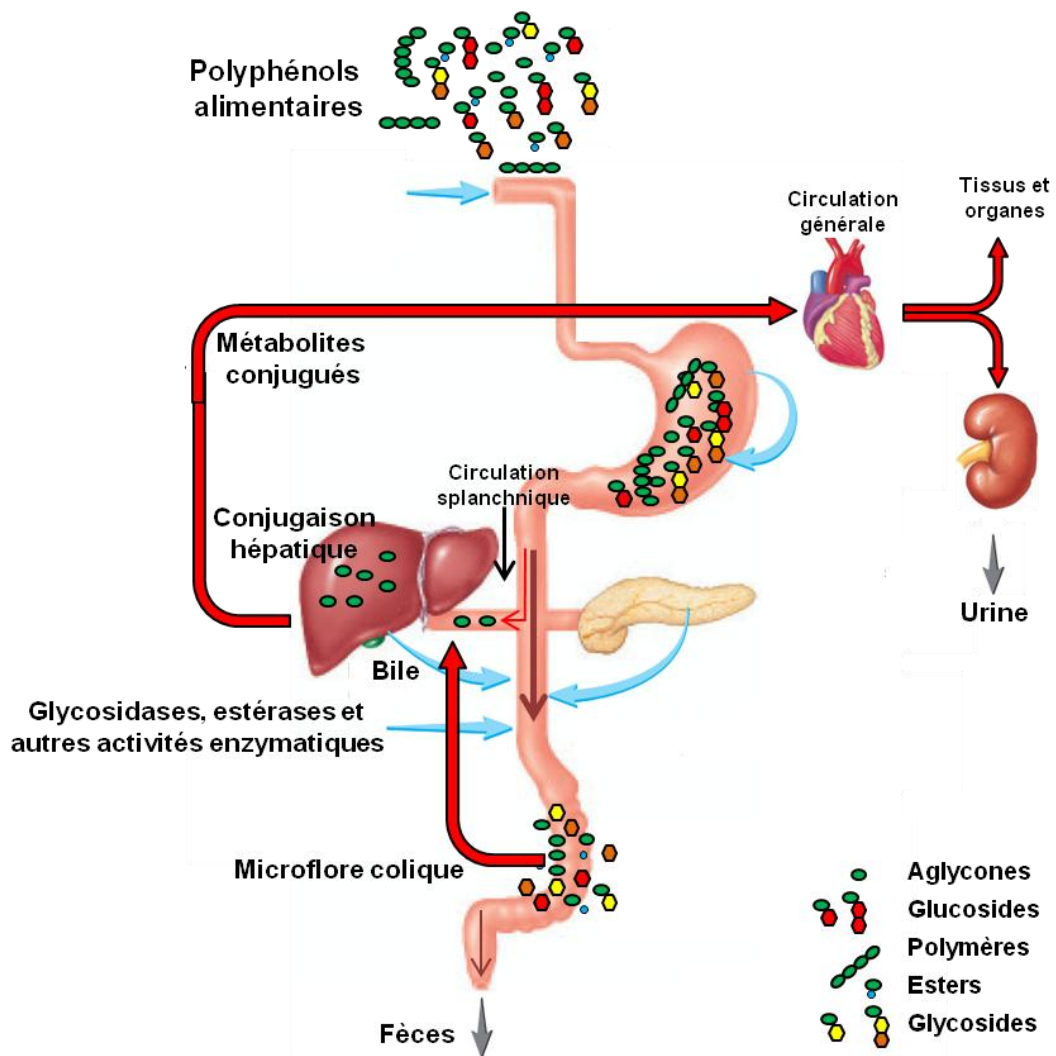


Figure 41 : Schéma général du métabolisme des polyphénols

i. Métabolites circulants

Les formes libres, ou aglycones, peuvent être directement absorbées au niveau de l'intestin grêle, alors que les formes glycosylées doivent être hydrolysées par des glycosidases de la flore intestinale au niveau du côlon avant d'être absorbées. Considérant la forte capacité de conjugaison des polyphénols au niveau intestinal et hépatique, les aglycones sont le plus souvent absents dans le plasma après consommation de polyphénols à doses nutritionnelles (Manach *et al.*, 2004). Les polyphénols glycosylés ou estérifiés natifs ne sont en général pas retrouvés non plus dans le sang. Les seuls produits identifiés sont les métabolites sulfatés, glucuronidés et/ou méthylés issus du métabolisme intestinal et hépatique, les glucuronides constituant les principales formes circulantes (D'Archivio *et al.*, 2010).

Dans le plasma, les métabolites des polyphénols sont liés aux protéines plasmatiques et en particulier à l'albumine, avec cependant des variations d'affinité selon les molécules (Boulton *et al.*, 1998), mais il a été montré qu'ainsi, ils peuvent conserver leur capacité antioxydante intrinsèque (Dangles *et al.*, 1999). Le degré de liaison à l'albumine a un impact sur la clairance des métabolites ainsi que sur leur délivrance aux cellules et tissus (Manach *et al.*, 2004). Malgré l'augmentation de l'hydrophilie due à la liaison à l'albumine, les polyphénols interagissent avec la membrane plasmique par des liaisons hydrogènes contractées à pH physiologique entre les groupements hydroxyles de la molécule et les têtes polaires des phospholipides (Verstraeten *et al.*, 2003). Ainsi, il semblerait que les polyphénols conservent, malgré leur liaison à l'albumine, leur capacité de liaison aux cellules.

ii. Concentrations plasmatiques

Les concentrations plasmatiques des polyphénols varient en fonction de la nature des molécules consommées et des aliments sources consommés. Ainsi, la concentration plasmatique maximale d'épicathéchine (EC), un flavonol, est de 0,2-0,3 μM après consommation de 32 mg d'équivalents EC dans le thé vert décaféiné (Lee *et al.*, 1995) ou de 122 mg d'équivalents EC dans le cacao (Rein *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2000). La concentration plasmatique en quercétine, autre flavonol, peut aller de 0,3 à 0,75 μM après consommation de 80 à 100 mg d'équivalents aglycone à partir de pommes, d'oignons ou d'un repas riche en produits végétaux (Hollman *et al.*, 1997 ; Manach *et al.*, 1998).

iii. Distribution dans les tissus et organes

Les polyphénols ingérés peuvent pénétrer dans les tissus et organes, en particulier au niveau des lieux de métabolisation comme l'intestin et le foie. En effet, des études menées avec divers polyphénols marqués (quercétine, épigallocatechine, quercétine 4'-glucoside, resvératrol, cyanidine 3-glucoside) ont montré que, 1 à 6 h après l'ingestion, la radioactivité était principalement détectée dans le sang et les organes du système digestif. Toutefois, les polyphénols ont également été détectés dans des organes tels que le cerveau, le cœur, les reins, le thymus, le pancréas ou la prostate. Les concentrations en polyphénols dans ces organes étaient de 30 à 3000 ng d'équivalents aglycones/g de tissu selon le polyphénol considéré, la dose ingérée et l'organe analysé (Manach *et al.*, 2004). Ainsi, après une administration orale chronique de tangéretine, une flavone polyméthoxylée, chez le rat durant 28 j, la concentration cérébrale de tangéretine était 6 fois plus élevée que dans les autres organes testés (cœur, poumon, foie, rein). De plus, une sélectivité régionale a aussi été observée dans le cerveau (Datla *et al.*, 2001), avec une distribution hétérogène de la tangéretine, 10 fois plus élevée dans l'hypothalamus, l'hippocampe et le striatum que dans le tronc cérébral et le cervelet.

iv. Voies d'élimination

Les polyphénols sont principalement excrétés par les voies biliaire et urinaire. L'implication de chacune de ces voies dépend principalement de la structure des molécules. Ainsi, les métabolites hautement conjugués sont principalement éliminés dans la bile, alors que les petits conjugués comme les

monosulfates suivent préférentiellement la voie urinaire (Crespy *et al.*, 2003). La voie biliaire est particulièrement impliquée dans l'élimination de polyphénols comme la génistéine ou l'épigallocatechine gallate (Sfakianos *et al.*, 1997 ; Kohri *et al.*, 2001). Les métabolites sont déversés avec la bile dans le duodénum, avant d'être éventuellement hydrolysés par les β -glucuronidases de la flore colique pour libérer les formes aglycones qui peuvent être réabsorbées au niveau de la muqueuse colique, l'ensemble constituant ainsi le cycle entérohépatique (Manach *et al.*, 2004). La quantité de métabolites excrétés dans les urines est corrélée à la concentration plasmatique maximale des polyphénols. L'excrétion urinaire varie d'une molécule à l'autre et peut correspondre à 0,3 à 43% de la quantité ingérée. Cette voie d'excrétion est faible pour les anthocyanes, les flavanols et les flavonols, mais particulièrement élevée pour les acides phénoliques et les isoflavones (Manach *et al.*, 2005).

d. Propriétés biologiques

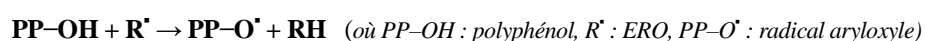
i. Propriétés antioxydantes

La capacité antiradicalaire des polyphénols, plus particulièrement les flavonoïdes, a fait l'objet de nombreuses études récentes dans le domaine des thérapies antioxydantes, pour compenser l'insuffisance des systèmes endogènes et réguler l'équilibre rédox dans certains désordres comme le vieillissement pathologique. L'activité antioxydante des polyphénols peut s'exprimer sous plusieurs formes des radicaux libres. Ils peuvent ainsi intervenir en captant directement ces radicaux, en chélatant les cations métalliques, en inhibant les enzymes responsables de la génération des ERO, ou en protégeant des systèmes de défense antioxydants.

ii. Mécanisme d'action des flavonoïdes contre les ERO

• Piégeage des radicaux libres

Les polyphénols sont de puissants inhibiteurs de la peroxydation lipidique, puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH_2 situé entre deux liaisons doubles dans les AGPI. Ils constituent donc des éléments importants pour la protection des membranes cellulaires. La structure chimique des polyphénols leur confère en effet la capacité de fixer directement les radicaux libres. L'interaction des polyphénols avec de nombreux radicaux a été très étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. Grâce à leur faible potentiel redox (Pietta, 2000), les polyphénols, et plus particulièrement les flavonoïdes, ont la capacité thermodynamique de piéger les molécules pro-oxydantes comme les radicaux superoxyde, peroxyde, alkoxyde et hydroxyde, par la réaction de transfert d'hydrogène détaillée ci-après.



Le radical aryloxyde (PP-O^{\bullet}) peut réagir avec un autre radical (R'^{\bullet}) pour former une structure quinone stable (Figure 42). Éventuellement, le radical aryloxyde peut réduire le dioxygène pour donner

une quinone et un anion superoxyde, expliquant l'effet parfois pro-oxydant des polyphénols (Yen *et al.*, 1997). Ainsi, la capacité antioxydante des polyphénols dépend non seulement du potentiel redox du couple PP-O[•] /PP-OH mais aussi de la réactivité du radical PP-O[•].

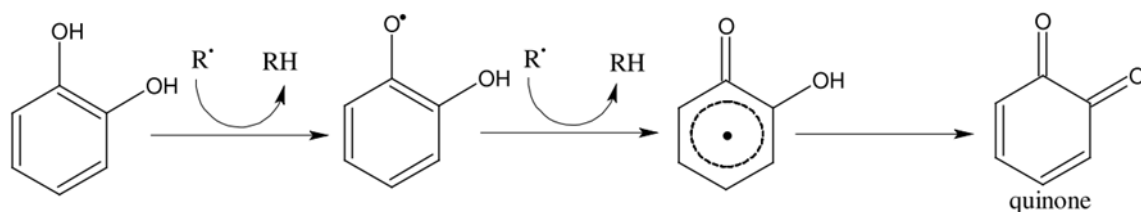


Figure 42 : Piégeage des espèces radicalaires par les composés phénoliques

De nombreuses études ont montré que la capacité des polyphénols à piéger les radicaux libres dépend essentiellement de leur structure chimique (Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Pietta, 2000). En effet, la structure aromatique est responsable de la délocalisation d'électrons (Figure 43), ce qui stabilise par conséquent le radical aroxy et les groupements hydroxyles qui participent aux réactions d'oxydo-réduction en donnant un électron (Fraga *et al.*, 2010). Ainsi, la protection de l'un de ces groupements par une glycosylation réduit les propriétés antioxydantes de la molécule, alors que l'ajout d'un groupement hydroxyle supplémentaire semble plutôt à même de les potentialiser. L'EGCG, la catéchine, la quercétine, la lutéoline, la myricétine et l'apigénine, ainsi que des acides phénoliques tels que les acides caféique et chlorogénique, sont parmi les composés les plus antioxydants.

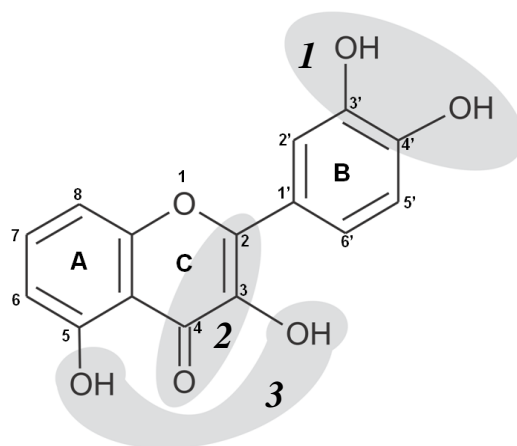


Figure 43 : Propriétés structurales associées à une activité antioxydante maximale des flavonoïdes (d'après Fraga *et al.*, 2010)

Chiffres italiques : ordre de priorité de chaque groupe pour assurer la rupture des chaînes radicalaires

- **Chélation des cations métalliques**

Les ions ferreux et cuivreux sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques en tant que constituants des hémoprotéines ou cofacteurs de différentes enzymes antioxydantes (*e.g.* Fe pour la catalase, Cu et Zn pour la superoxyde dismutase). Cependant, ces cations métalliques peuvent aussi être des sources de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène par autoxydation, ou de radical hydroxyle par la réaction de Fenton : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$ (ou Cu^+) \rightarrow $\text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$ (ou Cu^{2+}).

Les flavonoïdes sont connus par leur capacité à former des complexes stables avec les ions métalliques, inhibant alors les réactions produisant des ERO. Le comportement de chélateur des ions métalliques de certains flavonoïdes se produit préférentiellement en : (i) les groupes 3-hydroxy et 4-oxo du cycle C, puis (ii) les groupes 4-oxo et 5-hydroxy et (iii) les groupes 3'-hydroxy et 4'-hydroxy du cycle B (Ren *et al.*, 2008), enfin les groupes 6-hydroxy et 7-hydroxy du cycle A (Perez *et al.*, 2009) (Figure 44). Ainsi, la quercétine est un complexant métallique particulièrement efficace.

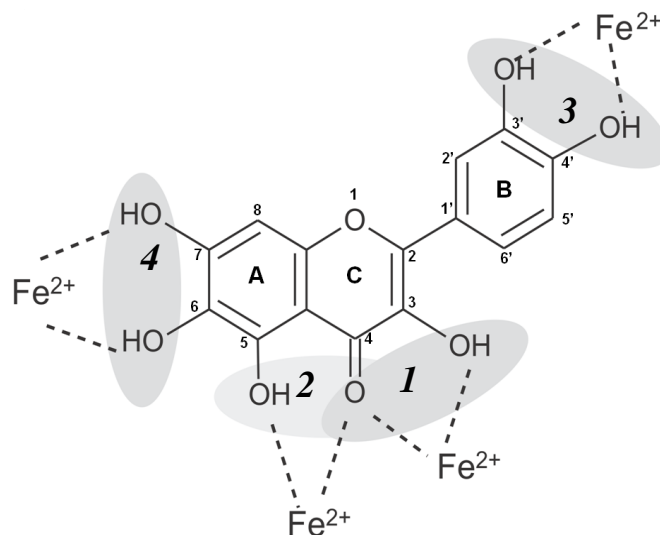


Figure 44 : Sites de chélation des ions métalliques sur la quercétine (d'après Fraga *et al.*, 2010)

Chiffres italiques : ordre de priorité de chaque groupe pour assurer la chélation des ions ferreux

- **Inhibition des enzymes responsables de la production des ERO**

Les polyphénols sont responsables de l'inhibition de nombreuses enzymes comme la xanthine oxydase, la NADPH oxydase, les cyclooxygénases, les lipoxygénases et les NO (oxyde nitrique) synthases. Les modes d'inhibition peuvent être différents selon le flavonoïde et l'enzyme étudié. L'inhibition de la production des ERO par les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes, peut procéder directement par formation d'un complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage direct des ERO. Cette double action est bien illustrée par le cas de la xanthine oxydase. Cette enzyme catalyse la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique, générant en parallèle le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène à partir du dioxygène. Ainsi, les flavonoïdes pourraient agir sur l'activité de la xanthine oxydase et réduire en conséquence à la fois les concentrations d'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains (Hanasaki *et al.*, 1994 ; Cos *et al.*, 1998).

- **Régulation des enzymes antioxydantes**

Si les polyphénols limitent l'oxydation des structures cellulaires en piégeant les radicaux libres, ils peuvent aussi agir en élevant les niveaux d'expression et d'activité des enzymes antioxydantes. Ainsi, certains polyphénols comme l'EGCG, la quercétine, la lutéoline ou le resvératrol augmentent l'expression et l'activité de la superoxyde dismutase, de la glutathion peroxydase, de la glutathion réductase et de la catalase (Ashokkumar & Sudhandiran, 2008 ; Yao *et al.*, 2010 ; Sun *et al.*, 2012). Les

polyphénols peuvent activer le facteur de transcription Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) qui, en se liant aux sites ARE (*Antioxidant Responsive Element*) et EpRE (*Electrophile Response Element*) des régions régulatrices, peut alors activer l'expression de gènes cibles comme la γ -glutamylcystéine synthétase, l'enzyme clé de la synthèse du glutathion, l'antioxydant endogène le plus important dans les cellules (Myhrstad *et al.*, 2002 ; Moskaug *et al.*, 2005 ; Boettler *et al.*, 2011).

iii. Propriétés anti-inflammatoires

Les polyphénols possèdent aussi des propriétés anti-inflammatoires remarquables. Plusieurs études ont en effet mis en évidence l'action de ces composés et de leurs métabolites comme modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation. Les études menées chez l'homme ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes chez des adolescents ou des sujet âgés est inversement corrélé aux marqueurs plasmatiques de l'inflammation dont la protéine C-réactive, l'IL-6 et le TNF- α (Helmersson *et al.*, 2009 ; Holt *et al.*, 2009). L'augmentation du pouvoir antioxydant plasmatique dû à une consommation de jus de fruits concentré a été associée à une augmentation des capacités antioxydantes accompagnée d'une diminution des cassures de brins d'ADN (Nantz *et al.*, 2006). Des études d'intervention ont évalué l'efficacité d'une supplémentation riche en polyphénols sur l'activité anti-inflammatoire. Dans un essai clinique supplémentant 120 sujets âgés de 40 à 74 ans avec 300 mg/j d'anthocyanes durant 3 semaines, la production de cytokines et de chimiokines (IL-4, IL-13, IL-8, et interféron α) par la voie de signalisation NF- κ B est apparue diminuée significativement chez les sujets supplémentés par rapport au groupe placebo (Karlsen *et al.*, 2007). Une autre étude randomisée en double aveugle réalisée a montré qu'une consommation d'huile d'olive riche en polyphénols (30 mg/j) pendant 4 mois par des sujets hypertendus permet d'améliorer la fonction endothéliale et de diminuer la pression artérielle (Moreno-Luna *et al.*, 2012). Le mécanisme impliqué repose sur la stimulation de la synthèse de NO, médiateur qui contrôle la vasodilatation dépendante de l'endothélium, inhibe l'agrégation plaquettaire, module les interactions entre les leucocytes et l'endothélium et inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses. Par ailleurs, l'huile d'olive riche en polyphénols a pu aussi réduire significativement les LDL oxydées (*ox-LDL*) et la protéine C-réactive impliquées de façon prépondérante dans les réactions inflammatoires.

Des études *in vitro* et *in vivo* ont aussi montré que des polyphénols comme la lutéoline ou l'apigénine inhibent la production de cytokines telles qu'IL-4, IL-5 et IL-13 (Hirano *et al.*, 2004), ainsi que les enzymes COX-2 et 5-LOX (Kim *et al.*, 2006). De même, la quercétine inhibe la voie de signalisation des MAPK (*Mitogene-Activated Protein Kinases*) et l'activation de facteurs de transcription inflammatoires, induisant une diminution de la production d'IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α et COX-2 dans les macrophages infiltrés (Overman *et al.*, 2010 & 2011). Park *et al.* (2008) ont montré que l'astragaline, la fisetine, le kaempférol, la myricétine, la quercétine et la rutine peuvent inhiber l'élévation du taux de calcium intracellulaire, ainsi que l'expression et la sécrétion d'IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α dans les mastocytes. Les polyphénols d'huile d'olive inhibent également l'expression de COX-2 dans les cellules

cancéreuses du côlon (Corona *et al.*, 2007). Ces composés sont susceptibles aussi de diminuer la libération d'histamine dans les basophiles et les mastocytes (Matsuo *et al.*, 1997 ; Park *et al.*, 2008) et sont capables d'inhiber l'adhésion et l'agrégation des plaquettes (Vita, 2005). L'effet protecteur des polyphénols au niveau cérébral impliquerait divers effets comme la capacité d'activer la signalisation synaptique, stimuler le flux sanguin (Williams & Spencer, 2012) et la protection des neurones contre les atteintes des neurotoxines (Vauzour *et al.*, 2007) et de la neuroinflammation, caractérisée par l'activation des cellules gliales et la libération accrue de facteurs inflammatoires (Vauzour, 2012).

Il est actuellement bien admis que les polyphénols exercent leur activité anti-inflammatoire en agissant sur la voie de signalisation des kinases et l'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B. L'un des principaux mécanismes d'action anti-inflammatoire de ces composés est l'inhibition de l'expression des enzymes du métabolisme de l'ARA comme les PLA₂, COX et LOX, réduisant ainsi la production de prostanoïdes et de leucotriènes. Enfin, les polyphénols agissent sur la production de NO en modulant l'activité de la NO synthase, la libération de cytokines, l'activation de NAPDH oxydase et enfin le stress oxydant (Santangelo *et al.*, 2007 ; Williams & Spencer, 2012).

iv. Propriétés anti-apoptotiques

Les polyphénols peuvent moduler des cascades de signalisation cellulaire régulant la survie cellulaire, notamment la voie des MAPK (Schroeter *et al.*, 2002 ; Williams *et al.*, 2004). Citons à titre d'exemple l'épicatéchine et son métabolite, la 3'-O-épicatéchine méthylée, qui protègent les neurones primaires du striatum contre la mort cellulaire induite par les Ox-LDL en inhibant l'activation des *c-Jun N-terminal Kinases* 1 et 2 (JNK1/2), *c-Jun* et caspase-3 (Schroeter *et al.*, 2001). Ces composés modulent aussi les voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire en augmentant la phosphorylation de ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases*), Akt et CREB dans les neurones primaires corticaux (Schroeter *et al.*, 2007). Ainsi, l'hespérétine et son métabolite, la 5-nitro-hespérétine, protègent les neurones en activant les voies de signalisation ERK et Akt, induisant une inhibition des protéines pro-apoptotiques Bad (*Bcl-2-associated death promoter*) et ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*) ainsi de l'activation des caspases (Vauzour *et al.*, 2007). De plus, EGCG augmente l'expression de Bcl-2 anti-apoptotique et diminue celle de Bax (*Bcl-2-associated X protein*) pro-apoptotique ainsi la surexpression de P53 (*tumor protein 53*) des muscles squelettes chez de rat souffrant de lésions des nerfs périphériques (Renno *et al.*, 2012). Une étude récente a montré également que l'EGCG, la quercétine et le carvédilol pourraient inhiber l'apoptose des myocytes cardiaques en empêchant le raccourcissement des télomères et la perte de TRF-2 (*Telomere Repeat-binding Factor*) qui joue un rôle majeur dans la protection des télomères contre la fusion des chromosomes (Sheng *et al.*, 2011).

v. Propriétés anti-amyloïdes

La génération du peptide A β par clivage de la protéine APP au site β représente l'un des facteurs déterminants des phases précoces de la MA. Par leur capacité d'inhiber l'enzyme BACE1 responsable

de ce clivage, différents polyphénols présentent un intérêt préventif évident dans ce contexte. Ainsi, la myricétine et la quercétine réduisent significativement le niveau de peptide A β sécrété par les neurones corticaux primaires de rat (Shimmyo *et al.*, 2008b). Sur le même modèle *in vitro*, la même équipe a montré qu'une administration simultanée d'EGCG ou de curcumine inhibent de manière dose-dépendante la surexpression de BACE1 induite par A β 42 (Shimmyo *et al.*, 2008a). D'autres études *in vitro* et *in vivo* sur des modèles transgéniques de MA ont rapporté un effet bénéfique de polyphénols contre la toxicité d'A β . Une étude récente a montré qu'une supplémentation en acide tannique pendant 6 mois peut prévenir le déclin cognitif, réduire l'amyloïdose cérébrale et favoriser la voie non amyloïdogène en inhibant l'expression de BACE1 chez les souris PS/APP modèles de la MA. De plus, l'acide tannique inhibe de manière dose-dépendante la production de peptide A β dans les cellules SweAPP-N2a de la lignée de neuroblastome de souris N2a exprimant la protéine mutante humaine APP_{swe} recombinante (Mori *et al.*, 2012). Dans ce même objectif, les polyphénols peuvent activer la voie non amyloïdogène, comme l'EGCG qui active l'enzyme α -sécrétase ADAM 10 dans les cellules SweAPP-N2a (Obregon *et al.*, 2006). Cet effet bénéfique a été observé *in vitro* et *in vivo* (Rezai-Zadeh *et al.*, 2005). Plus récemment, une étude a suggéré que le traitement préalable ou simultané par la myricétine puisse protéger de manière dose-dépendante les neurones primaires de rat contre la toxicité induite par le peptide A β . De plus, ce polyphénol diminue d'une façon significative le niveau de peptide A β dans le milieu de culture en activant l'expression d'ADAM 10 et en inhibant celle de BACE1 dans les neurones primaires (Shimmyo *et al.*, 2008c). Toutefois, certains polyphénols comme le resvératrol ne semblent pas agir en inhibant la production de peptide A β , mais en favorisant sa dégradation par le protéasome (Marambaud *et al.*, 2005).

Les polyphénols sont aussi de puissants inhibiteurs de la formation *in vitro* des formes fibrillaires de peptide A β grâce à leurs structures capables d'inhiber directement la formation du noyau amyloïde (Porat *et al.*, 2006). Certains polyphénols, tels que myricétine, morine, quercétine, kaempférol, catéchine et épicatechine par exemple, peuvent inhiber de façon dose-dépendante la formation de fibrilles A β tout en déstabilisent celles déjà constituées (Ono *et al.*, 2003). Ainsi, il a été montré que la quercétine pourrait se fixer réversiblement et préférentiellement au peptide A β sous forme fibrillaire plutôt qu'oligomérique (Hirohata *et al.*, 2007). De plus, il a été mis en évidence que l'EGCG inhibe fortement la fibrillogénèse d'A β en se fixant préférentiellement aux peptides non pliés, mais aussi en empêchant leur conversion en intermédiaires toxiques sur la voie de l'agrégation (Figure 45), ce qui prévient en conséquence la formation des agrégats riches en feuillets bêta toxiques (Ehrnhoefer *et al.*, 2008). Enfin, une étude récente a proposé que les noyaux aromatiques de polyphénols pourraient interagir avec ceux de résidus clés du peptide A β pour favoriser la formation des agrégats A β moins toxiques que les oligomères (Fuentealba *et al.*, 2012). La Figure 46 résume toutes les propriétés anti-amyloïdes des polyphénols.

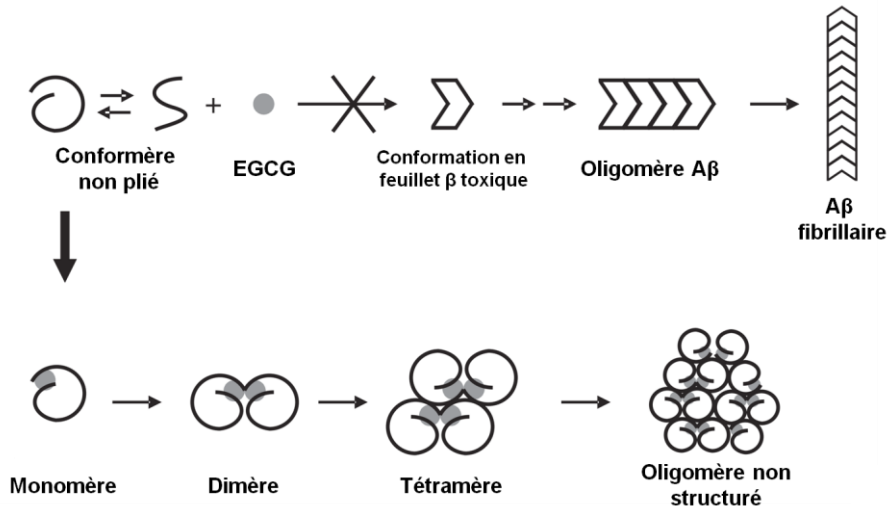


Figure 45 : Inhibition de la formation des fibrilles Aβ par l'EGCG (d'après Ehrnhoefer *et al.*, 2008)

vi. Propriétés neuroprotectrices

Les propriétés neuroprotectrices des polyphénols ont été rapportées *in vitro*, *in vivo* et chez l'homme. En effet, la co-incubation de neurones préfrontaux de rat en culture primaire en présence de curcumine et du peptide Aβ permet d'observer un effet neuroprotecteur significatif contre la toxicité d'Aβ. Ainsi, la curcumine inhibe l'activation de la caspase-3 et la chute de l'expression de Bcl-2 induites par le peptide Aβ (Qin *et al.*, 2009). Sur le même type de cellules, les polyphénols de thé vert protège aussi contre la toxicité du peptide Aβ intracellulaire en inhibant la diminution du niveau de P-Akt induite par le peptide (Qin *et al.*, 2012).

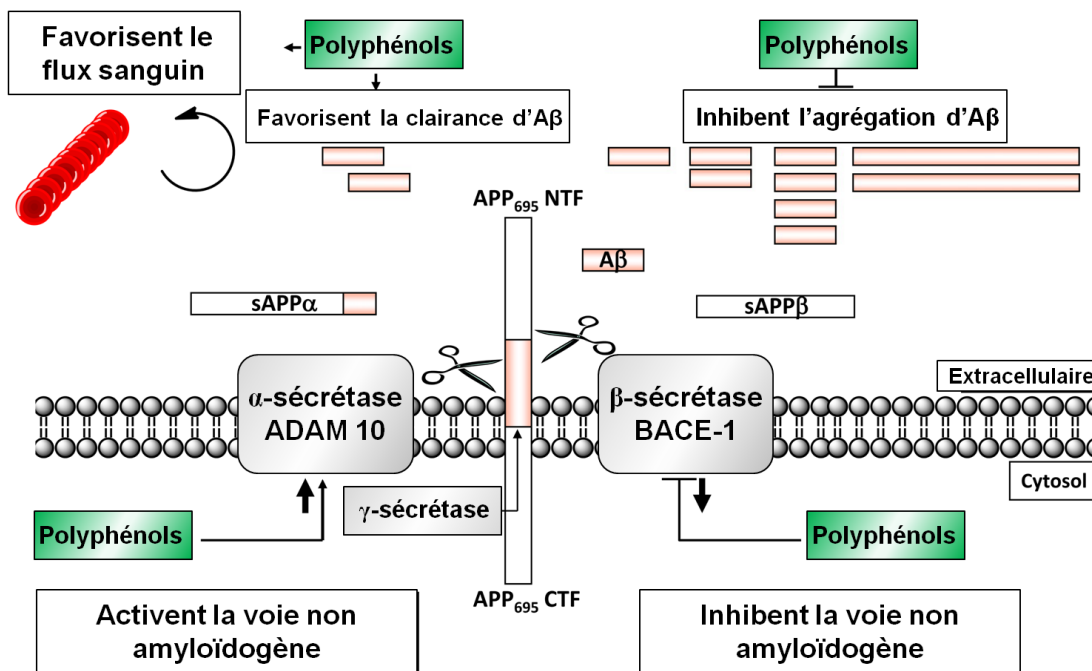


Figure 46 : Propriétés anti-amyloïdes des polyphénols (d'après Williams & Spencer, 2012)

Une autre étude récente a montré que les polyphénols protègent les neurones hippocampiques de rat en culture primaire contre la mort neuronale et les altérations morphologiques induites par le peptide A β soluble. En outre, cette co-incubation pourrait récupérer la chute de la fréquence calcique transitoire induite par le peptide A β et préserver l'activité synaptique. D'ailleurs, l'immunomarquage de la protéine MAP-2 (*microtubule-associated protein*) révèle une préservation des arbres dendritiques modifiés par le peptide A β soluble (Fuentealba *et al.*, 2012). *In vivo*, la supplémentation alimentaire en Polyphenon E, un mélange composé à 63% d'EGCG et 11% d'épicatéchine, durant 26 semaines améliore significativement les capacités de mémorisation du jeune rat (Haque *et al.*, 2006) et prévient les troubles de la mémoire à court terme induits par l'infusion intracérébroventriculaire de peptide A β (Haque *et al.*, 2008), notamment en réduisant la production d'espèces oxydantes dans l'hippocampe. Ainsi, une supplémentation en catéchines du thé vert de souris SAMP-8 (*Senescence-Accelerated Mouse Prone*) modèle de MA pendant 6 mois pourrait améliorer les capacités d'apprentissage et protéger contre la perte de la mémoire spatiale tout en diminuant les taux d'oligomères A β dans l'hippocampe et en stimulant la voie de signalisation PKA/CREB (Li *et al.*, 2009). Par ailleurs, les flavanones et l'épicatéchine pourraient favoriser la phosphorylation d'Akt, inhibant ainsi l'activité de la GSK3 β et la phosphorylation de Tau (Schroeter *et al.*, 2007 ; Vauzour *et al.*, 2007).

Plusieurs études épidémiologiques d'observation ont évalué l'effet d'un régime riche en polyphénols sur le déclin cognitif ou la démence. Parmi ces études, l'étude Kame révèle que la consommation fréquente de jus de fruits (au moins 3 fois par semaine) est associée à une prévalence significativement moindre de la MA. L'ajustement des résultats aux quantités totales de vitamines E, C et β -carotène consommées permet de conclure que l'effet est très probablement attribuable à d'autres composants, dont les polyphénols (Dai *et al.*, 2006). Deux études PAQUID ont apporté également des arguments en faveur d'un rôle protecteur des polyphénols contenus dans les fruits et légumes contre la démence ou le déclin cognitif (Commenges *et al.*, 2000 ; Letenneur *et al.*, 2007). Une relation similaire entre la consommation de légumes supérieure à la médiane et le risque de déclin cognitif a été retrouvée au sein d'un groupe de 2.258 personnes issues de l'étude WHICAP (*Washington Heights-Inwood Columbia Aging Project*, Scarmeas *et al.*, 2006). Une étude prospective a mis en évidence une diminution du risque de déclin cognitif chez 15.080 femmes âgées de 70 ans ou plus consommant souvent des légumes verts à feuilles, riches en lutéine et zéaxanthine (Kang *et al.*, 2005). Ces résultats sont retrouvés dans l'étude CHAP qui rapporte un déclin cognitif moins rapide chez 3.718 personnes âgées de 65 ans ou plus consommant au moins 4 portions de légumes par jour, surtout pour les légumes verts à feuilles, sans observer d'effet protecteur de la consommation de fruits (Morris *et al.*, 2006). Cependant, une étude récente a révélé qu'une consommation élevée à long terme de fruits rouges riches en anthocyanidines et flavonoïdes est associée à un déclin cognitif significativement moindre chez 16.010 femmes âgées en moyenne de 74 ans, ce qui pourraient contribuer à retarder de 2,5 ans le déclin cognitif lié au vieillissement (Devore *et al.*, 2012). Dans l'étude 3C, une consommation quotidienne de

fruits et légumes crus et cuits a été associée à une diminution de 30% du risque de démence dans les 4 ans qui suivent (Barberger-Gateau *et al.*, 2007). Une autre étude épidémiologique appelée PREDIMED (*PREvención con Dieta MEDiterránea*) s'est intéressée aux différents composants du régime méditerranéen sur la cognition chez le sujet âgé. L'étude a été menée sur un groupe de 447 sujets âgés de 55 à 80 ans sans trouble cognitif mais à risque cardiovasculaire élevé. La consommation d'huile d'olive vierge, de noix, de vin et de café a été associée à une meilleure fonction cognitive globale et une mémoire renforcée. De même, la concentration urinaire de polyphénols a été corrélée à de meilleurs scores en mémoire verbale immédiate (Valls-Pedret *et al.*, 2012). De plus, des études transversales ont trouvé une association entre la consommation de thé vert (riche en polyphénols, particulièrement en catéchines) et les fonctions cognitives chez l'homme. Une étude japonaise sur 1.003 personnes âgées de 70 ans et plus a rapporté qu'une consommation élevée de thé vert serait associée à une réduction de la prévalence des déficiences cognitives évaluées à l'aide du MMSE (Kuriyama *et al.*, 2006). Ces résultats ont été confortés par une étude plus récente menée chez 2.501 personnes âgées de 55 et plus (Ng *et al.*, 2008). Plus récemment, une étude intéressante réalisée auprès de 12 personnes âgées de 21-28 ans a révélé que la consommation d'extrait de thé vert induit une augmentation significative de l'activité cérébrale, évaluée à l'aide de techniques d'imagerie cérébrale, dans le cortex préfrontal dorso-latéral (DLPFC), une zone cérébrale indispensable à la mémoire à court terme (Borgwardt *et al.*, 2012).

vii. Propriétés neurotrophiques

Nous venons de citer de nombreuses études *in vitro*, *in vivo* et menées chez l'homme avec des aliments ou boissons riches en polyphénols qui rapportent une amélioration de la mémoire et de la cognition. Cependant, les seules propriétés antioxydantes, qui ont longtemps été considérées comme étant le principal mode d'action expliquant les effets protecteurs des ces composés, semblent insuffisantes pour expliquer les effets bénéfiques des polyphénols au niveau cérébral, d'autant que la concentration de ces composés retrouvés à ce niveau est relativement faible par rapport à celle de vitamines comme l'acide ascorbique ou l' α -tocophérol (Spencer, 2008). Les flavonoïdes ont été montrés capables de traverser la barrière hémato-encéphalique *in vivo*, mais cette capacité semble nettement influencée par la lipophilie et les interactions avec des transporteurs (Youdim *et al.*, 2004).

Les polyphénols semblent pouvoir agir en protégeant les neurones vulnérables, en stimulant le fonctionnement neuronal et le flux sanguin, ainsi qu'en favorisant la neurogenèse (Vauzour, 2012 ; Williams & Spencer, 2012). En effet, les polyphénols et leurs métabolites pourraient se fixer à différents récepteurs cellulaires comme les récepteurs δ -opioïdes, TrkB, du GABA (A), de la nicotine, des estrogènes et de la testostérone. Une fois liés à leurs récepteurs, ces composés modifient l'activation des kinases, y compris les voies MAPK, PI3 et NF- κ B, ce qui pourrait moduler la plasticité neuronale et stimuler la synthèse de nouvelles protéines synaptiques (Vauzour, 2012 ; Williams & Spencer, 2012). Ainsi, les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes, pourraient réguler l'expression d'un certain

nombre de gènes, y compris celui codant BDNF, en activant la voie des MAPK et CREB. Ils jouent ainsi un rôle particulièrement important pour préserver la survie neuronale et les fonctionnalités synaptiques du SNC. Ils modifient également la voie PI3-kinase en interagissant avec les sites de liaison de l'ATP, ce qui est susceptible d'améliorer la mémoire spatiale en modifiant la force synaptique et en induisant les changements morphologiques des épines dendritiques, indispensables pour l'apprentissage et la mémoire (Williams & Spencer, 2012).

Des données récentes suggèrent aussi une implication des polyphénols dans les processus de neurogenèse. Ce phénomène diminue progressivement avec l'âge, ce qui peut favoriser l'apparition des troubles de mémoire et de cognition (Drapeau & Nora Abrous, 2008). Une augmentation de la prolifération et de la différenciation cellulaires a été mise en évidence dans le gyrus denté des souris supplémentées en EGCG pendant un mois (Yoo *et al.*, 2010). Les mêmes effets ont été rapportés sur des souris âgées de 12 mois supplémentées avec des extraits de pépins de raisin, riche en composés phénoliques monomériques tels que la catéchine, l'épicatéchine et les proanthocyanidines (Yoo *et al.*, 2011). Ces résultats ont été confortés par une étude réalisée *in vitro* et *in vivo* dans laquelle de faibles concentrations de curcumine pourraient stimuler la différenciation des cellules progénitrices neuronales multipotentes de souris et augmenter nettement la prolifération de cellules souches neuronales dans l'hippocampe en activant les voies ERK et P38 MAPK (Kim *et al.*, 2008). Une étude intéressante a récemment montré que l'administration d'un régime riche en polyphénols et en AGPI à des souris adultes pendant 40 jours induit une augmentation de la prolifération et la différenciation des cellules souches neuronales dans les zones sous-ventriculaire et sous-granulaire (Valente *et al.*, 2009).

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Nous avons montré toute la complexité des mécanismes qui déterminent les risques et conduisent au développement la pathologie neurodégénérative qu'est la maladie d'Alzheimer. Elle débute par une très longue phase prodromique asymptomatique et silencieuse, lors de laquelle il est admis que les oligomères A β solubles (A β Os) sont les agents neurotoxiques responsables des atteintes synaptiques et de l'inhibition du processus mnésique de potentialisation à long terme. Les propriétés fusogènes du peptide A β suggèrent que la cascade moléculaire responsable des troubles observés puisse trouver son origine dans les interactions contractées par le peptide au niveau de la membrane plasmique. Il est donc fort logique de considérer que la nature de ces interactions dépendrait en particulier du statut lipidique, des propriétés physicochimiques et de l'architecture de la membrane plasmique. L'affinité particulière de ces oligomères pour les synapses a conduit à considérer que la synaptotoxicité des A β Os est responsable des premiers troubles cognitifs en conséquence des altérations synaptiques et mécanismes neurotoxiques qui mènent inéluctablement alors les neurones affectés à leur dégénérescence et leur mort. Il serait donc nécessaire d'intervenir le plus tôt possible dans cette cascade événementielle, idéalement en influant sur cette toute première étape qu'est l'interaction entre les oligomères et la membrane neuronale.

Prévenir et limiter les mécanismes qui mènent au déclin cognitif revêt une importance indiscutable dans un contexte dans lequel l'espérance de vie de nos populations augmente alors qu'aucun moyen thérapeutique curatif n'est encore disponible. Si l'on excepte la prise en compte et la portée des facteurs de risque, il est, hélas ou non, toujours quasiment impossible d'identifier les individus que l'avancée en âge orientera vers le vieillissement pathologique plutôt que normal ou réussi. De ce fait, chaque individu en milieu de vie peut être potentiellement concerné par la période asymptomatique plus ou moins longue, dont on sait qu'elle ne sera pas forcément suivie de la survenue clinique d'un processus neurodégénératif. C'est précisément durant cette période donc que doivent être appliquées des mesures visant à prévenir le déclin cognitif en s'adressant à la population générale, à l'instar des recommandations de santé publique préconisées pour prévenir les maladies cardiovasculaires chez tout un chacun. Il faut intégrer là le fait que les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires partagent de nombreux facteurs de risque communs, en particulier les paramètres relevant de l'alimentation et spécialement des lipides. De façon cohérente, de nombreuses études épidémiologiques et fondamentales réalisées ces dernières années soulignent le rôle déterminant de la nutrition dans les processus de vieillissement et il paraît donc raisonnable d'imaginer que des mesures efficaces contre les unes puissent être bénéfiques aussi contre les autres.

Les pertes synaptiques et neuronales exacerbées dans les processus neurodégénératifs ne résultent certainement pas de concentrations d'oligomères plus élevées dans le cerveau des patients, au moins dans les 99% des cas de MA qui correspondent à des formes sporadiques. Il semble plutôt là que ce soit les neurones âgés qui, sans doute en raison d'altérations encore mal connues et accumulées avec l'âge, offrent une susceptibilité supérieure au stress amyloïde. Plusieurs études, dont des nôtres, montrent clairement l'implication de perturbations du métabolisme et de la signalisation lipidiques dans les phases précoces de la MA, à travers leurs rôles de composants structuraux, de modulateurs de l'expression des gènes ou de seconds messagers contrôlant la survie cellulaire. Dans ce contexte, le DHA (C22:6, *n*-3) est l'acide gras le plus intéressant. Notre équipe a déjà montré *in vitro* que le DHA protège les neurones corticaux en culture de l'apoptose induite par les A β O. L'enrichissement membranaire en DHA est apparu capable de prévenir l'activation de plusieurs voies de signalisation proapoptotiques impliquant les sphingomyélinases et de préserver la phosphorylation et donc l'activité de kinases comme ERK1/2 impliquées dans des voies de survie cellulaire. Les effets neuroprotecteurs du DHA pourraient être davantage potentialisés par des formulations ou des molécules originales associant l'acide gras à d'autres composés doués de propriétés antioxydantes ou anti-inflammatoires comme les composés phénoliques qui ont déjà été proposés réduire le risque de MA grâce à une consommation régulière de fruits et légumes.

L'objectif général de cette thèse a été d'étudier, *in vitro* et *in vivo*, les mécanismes par lesquels le DHA peut protéger les synapses et les neurones des dysfonctionnements induits par les oligomères A β solubles. Il s'agissait donc de caractériser *in vivo* l'influence du statut lipidique sur les capacités mnésiques et les fonctions synaptiques chez la souris bénéficiant d'apports alimentaires en DHA et exposée aux A β O, tout en étudiant les mécanismes par lesquels les A β O induisent les dysfonctionnements synaptiques. L'approche *in vivo* s'appuie sur un modèle de souris conçu et caractérisé au laboratoire, considéré comme un modèle d'altérations précoces de la MA. Notre hypothèse de départ est donc qu'un apport enrichi en DHA favorise les processus de résistance au stress amyloïde, alors que le déficit en cet acide gras renforce en renforce la susceptibilité.

Ensuite, nous avons cherché à mettre en évidence d'éventuelles synergies en conséquence d'associant entre le DHA et des composés phénoliques naturels doués d'activités antioxydante et/ou anti-inflammatoire, dans le but de potentialiser les effets neuroprotecteurs contre les mécanismes délétères initiés par l'exposition aux A β O.

Enfin, nous avons voulu évaluer l'intérêt d'une stratégie nutritionnelle basée sur une huile de poisson riche en DHA notamment dans un contexte dyslipidémique, plus proche du déséquilibre

alimentaire que connaissent les populations humaines dont le régime alimentaire est plutôt riche en graisses saturées, en AGPI *n*-6 et en cholestérol. Dans le cadre d'un projet de recherche mené en partenariat avec la société Lesieur, nous avons voulu savoir si la dyslipidémie est un élément favorisant le déclin cognitif chez la souris et, le cas échéant, si une supplémentation en DHA notamment, éventuellement associé aux polyphénols de l'huile d'olive, peut prévenir ou corriger les effets délétères d'une dyslipidémie sur le risque cardiovasculaire et le déclin cognitif lié à l'âge ou en conditions de stress amyloïde. Les régimes élaborés dans cette étude ont été adoptés aussi avec le souci de définir des bases réalistes, notamment en termes de doses, en vue d'une application en nutrition humaine.

Cette étude a donc visé à vérifier les hypothèses suivantes :

- Une supplémentation alimentaire en DHA serait capable de normaliser les paramètres lipidiques et de limiter l'obésité et la dyslipidémie induite par un déséquilibre alimentaire.
- L'effet bénéfique sur la dyslipidémie pourrait se répercuter en protégeant du déclin cognitif lors du vieillissement normal ou éventuellement induit par un régime hyperlipidique.
- L'association entre les polyphénols d'huile d'olive vierge et le DHA permettrait de renforcer les effets bénéfiques du DHA sur les différents aspects suivis.
- La dyslipidémie pourrait rendre les souris plus sensibles à la toxicité induite par l'exposition aux A β O.
- La supplémentation nutritionnelle en DHA et éventuellement en polyphénols pourrait limiter l'impact cognitif induit par le peptide A β chez les animaux sous régime hyperlipidique.
- La supplémentation nutritionnelle en DHA et éventuellement en polyphénols pourrait limiter les effets délétères sur la santé d'une alimentation déséquilibrée, simultanément en prévenant le déclin cognitif et en réduisant le risque cardiovasculaire.

PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

A. Préparation des peptides

Le peptide A β (1-42) en provenance de Bachem (France) sont préparés selon la méthode décrite par Pillot *et al.* (1996 & 1999). Les peptides sont solubilisés dans l'hexafluoro-2-propanol (Sigma, France) à une concentration de 5 mg/mL. Au moment de l'utilisation, des aliquotes de la solution stock sont rapidement évaporés sous azote et solubilisés à la concentration voulue dans une solution de NaCl à 0,9% (m/v) et conservées en fractions aliquotes congelées à -20°C afin d'éviter l'agrégation des peptides. Ainsi préparée, la solution d'oligomères A β solubles contient un mélange de monomères, dimères, trimères et tétramères (Pillot *et al.*, 1996 & 1999; Malaplate-Armand *et al.*, 2006).

B. Animaux et conditions d'hébergement

Les souris de la souche C57BL/6J proviennent du centre d'élevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Elles sont hébergées dans une animalerie de stabulation dans des conditions standardisées de température ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), d'hygrométrie ($50 \pm 5\%$) et d'éclairage selon un cycle lumière/obscurité de 12 h. Disposant d'eau de boisson et de nourriture *ad libitum*, les souris sont systématiquement acclimatées aux conditions d'hébergement pendant un minimum de deux semaines avant le début des expériences. Elles sont manipulées selon une procédure respectant strictement les recommandations du Comité National de Réflexion Éthique sur l'Expérimentation Animale (agrément # 3925 CA-II du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, agrément # DDSV/54/04/ENV/065 de la Direction Départementale des Services Vétérinaires de Meurthe-et-Moselle).

C. Chirurgie stéréotaxique

1. Anesthésie

Les animaux sont opérés sous anesthésie générale induite par un mélange de kétamine (0,8%, m/v) et de xylazine (0,1%, m/v) dans du sérum physiologique, administré par voie intrapéritonéale à la dose de 1 mg de kétamine/10 g de souris. Après s'être assuré de la profondeur de l'anesthésie (retrait de la patte et reflexe cornéen), l'animal est placé dans l'appareil à stéréotaxie sur un coussin chauffant thermorégulé.

2. Injection intracérébrale

Le protocole adopté pour cette injection a été optimisé au laboratoire Lipidomix et a été décrit en détail (Youssef *et al.*, 2008). La souris sous anesthésie est placée dans un appareil stéréotaxique muni d'un microinjecteur automatique (Unimécanique, France). L'intervention chirurgicale est exécutée rapidement et dans des conditions aseptisées. La tête de la souris est maintenue en place grâce à un système de fixation sur les plans sagittal et frontal. La fixation sur le plan sagittal est réalisée grâce à deux barres d'oreilles introduites dans les orifices auditifs. La fixation sur le plan frontal se fait grâce à une plaque munie d'un

anneau dans lequel les incisives sont engagées jusqu'à leur base et la distance antéropostérieure est réglée en tirant la plaquette vers l'avant jusqu'à apprécier la résistance des incisives. La position de la tête est ajustée de manière à ce que la hauteur de la surface osseuse soit la même aux points lambda et bregma.

Une fois la souris placée dans l'appareil à stéréotaxie, la peau de la région dorsale du crâne est nettoyée avec une solution d'éthanol à 70% (v/v). Une incision médiale est réalisée depuis l'arrière de la ligne interoculaire jusqu'au début de la voûte occipitale. Le crâne est dégagé, puis gratté à l'aide du bistouri et nettoyé avec un coton légèrement imbibé d'eau oxygénée (3%). Ceci fait apparaître les sutures de croissance formant le repère anatomique correspondant au bregma et utilisé pour situer les différentes structures cérébrales dans l'espace selon un trièdre de référence. À l'aide des vis micrométriques, on définit les coordonnées du point « zéro » à partir duquel seront calculées les coordonnées stéréotaxiques d'injection en positionnant la pointe de l'aiguille du microinjecteur sur le *bregma*. Les coordonnées prises en compte pour le ventricule latéral droit et gauche sont celles de l'atlas stéréotaxique de souris (Paxinos & Franklin, San Diego, Calif.; London: Academic, 2001) et adaptées à nos conditions expérimentales :

- Antéropostériorité = 0,22 mm antérieurement au plan vertical frontal
- Latéralité = 1 mm latéralement au plan sagittal médian
- Profondeur = 2,5 mm par rapport au plan horizontal

À l'aide d'une fraise d'un diamètre de 0,5 mm, un petit orifice est percé dans la voûte osseuse en prenant soin d'éviter toute lésion du sinus veineux sagittal supérieur et du réseau capillaire sous-jacent. L'injection est réalisée avec une seringue Hamilton de 5 μ L (Supelco, 800 series, H85RN équipée d'une aiguille G26s, point style 3 blunt). Un volume de 1 μ L de la solution à 0,5 mM d'oligomères A β solubles ou de solution saline véhicule (NaCl 0,9% m/v) est injecté dans le ventricule latéral droit à un débit de 1 μ L/min. La quantité d'A β Os injectée est donc de 500 pmol, insuffisante pour induire l'apparition de dépôts amyloïdes détectables dans le cerveau des souris. L'injection achevée, l'aiguille est laissée en place pendant 2 min afin d'éviter le reflux de la solution injectée, puis retirée doucement. L'orifice est recouvert d'un film de cire hémostatique (Lukens Bone Wax) et la peau de la région dorsale du crâne est suturée. La zone de la chirurgie est désinfectée à l'aide de biseptine pour limiter le risque infectieux. La souris est replacée en cage individuelle afin de récupérer de l'anesthésie gazeuse et surveillée régulièrement durant 2 j après l'opération.

D. Analyses comportementales

1. Système de capture vidéo

Toutes les analyses comportementales sont enregistrées à l'aide d'une caméra couplée à un système de capture vidéo SMART (Bioseb, France), doté d'un mode « 3 points » qui détecte la morphologie globale de la souris et discrimine la tête, le centre de gravité et la base de la queue. Le système permet donc l'enregistrement et la quantification semi-automatisée des performances comportementales des animaux (Figure 47). Un fichier Excel est généré en fin d'expérience, consignait les mesures et permettant de réaliser les analyses.

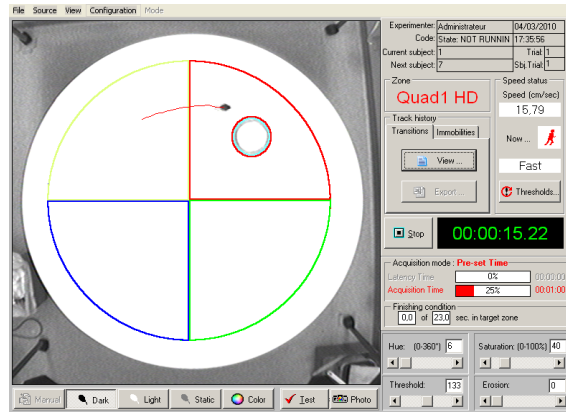


Figure 47 : Capture d'écran du logiciel de capture vidéo

2. Procédure standard d'évaluation des mémoires à court et à long terme

Après l'administration intracérébroventriculaire (ICV) de la solution véhicule ou d'oligomères A β solubles et avant toute analyse comportementale, les souris sont placées en acclimatation dans la pièce de comportement durant 20 à 30 min. Un scénario a été validé au laboratoire, incluant différentes étapes étalées sur 14 jours pour évaluer les capacités cognitives des souris à l'aide de différents tests comportementaux.

a. Étude de la mémoire spatiale à court terme

Le paradigme d'étude de la mémoire spatiale à court terme est un système composé de 3 bras (notés A, B et C) en plexiglas noir opaque de 40 cm de long, 10 cm de large, 14 cm de hauteur et orientés à 120° les uns par rapport aux autres. Le sol est en plexiglas transparent sous lequel sont glissées des plaques portant des figures géométriques servant d'indices spatiaux permettant à la souris de distinguer les différents bras (Figure 48).

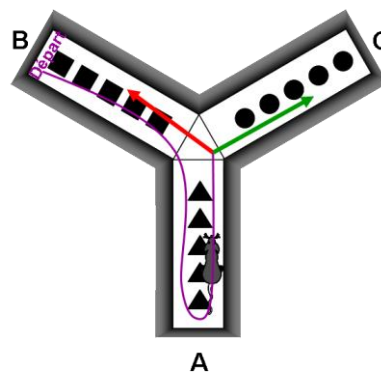


Figure 48 : Schéma du labyrinthe en Y pour l'évaluation de la mémoire à court terme

Dans cet exemple, la souris introduite dans le bras B va explorer le bras A. Lorsqu'elle en repart, elle a alors le choix entre le bras B duquel il provient (flèche rouge) et le bras C encore inexploré (flèche verte). Le choix du bras inexploré conduit à une alternance, ici B-A-C.

Le test se déroule hors de toute présence humaine, dans une pièce insonorisée dont les murs sont occultés à l'aide de rideaux noirs afin d'éviter toute interférence avec l'extérieur. Le labyrinthe est éclairé de manière indirecte de manière à obtenir une intensité faible (10 lux) dans les bras. Durant les 5 min que dure

le test, la souris explore librement le dispositif, sa seule motivation résidant dans son attrait naturel à explorer des environnements nouveaux. La séquence des bras visités est enregistrée à l'aide du système d'analyse vidéo, considérant que l'animal est entré dans le bras lorsque son train arrière passe une ligne fictive située à 5 cm de l'entrée du bras. Ce test possède un niveau de hasard de 50%. La performance de mémoire à court terme est déterminée par le calcul du pourcentage d'alternance spontanée (Youssef *et al.*, 2008). Une alternance est définie comme la visite successive de trois bras différents constituant un triplet. Les performances des souris faisant moins de 12 entrées ne sont pas considérées. Les triplets pouvant se chevaucher, le pourcentage d'alternance est calculé selon le rapport:

$$\text{Alternance (\%)} = \left(\frac{\text{Nombre d'alternances}}{\text{Nombre d'entrées} - 2} \right) \times 100$$

b. Étude de la mémoire spatiale à long terme

La piscine de Morris (Figure 49) est un dispositif largement utilisé pour étudier la mémoire spatiale de référence et à long terme chez le rongeur. Le paradigme est un réservoir circulaire de 80 cm de diamètre et 60 cm de hauteur, rempli au 2/3 d'eau opacifiée avec un colorant blanc. Ce dispositif contient aussi une plateforme immergée de position fixe dans la version mémoire de référence. La base de ce test est de forcer l'animal à créer une carte spatiale (Morris, 1984) en utilisant des indices externes à la piscine pour lui permettre de trianguler sa position dans l'espace, afin de se localiser et de rejoindre la plateforme immergée. La motivation dans ce test repose sur le caractère aversif de la situation aquatique. La température de l'eau est la même que celle de la pièce, maintenue entre 19 et 21°C. L'intensité d'éclairage est de 100 lux.

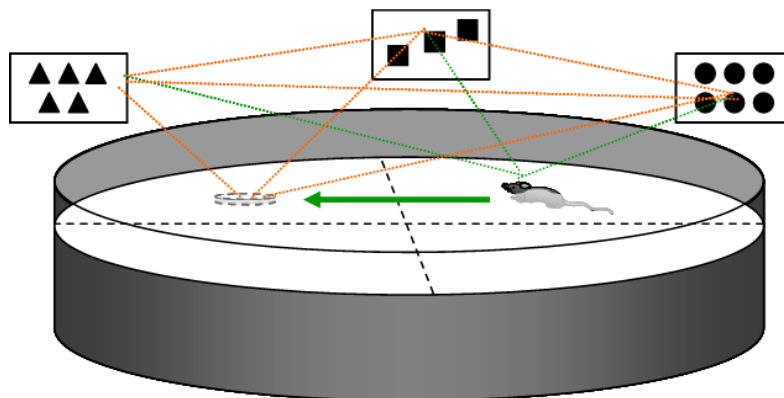


Figure 49 : Schéma du dispositif d'évaluation de la mémoire à long terme

La représentation cognitive des relations spatiales entre les indices à l'extérieur de la piscine et la position de la plateforme (pointillés orange) constituent la carte spatiale. L'utilisation de cette représentation permet à l'animal de se localiser (pointillés vert) pour inférer la position de la plateforme (flèche verte).

Le test se déroule en trois phases : habitude, apprentissage spatial et restitution (*probe test*).

- **Phase d'habitude.** Cette phase vise à familiariser l'animal avec les conditions d'expérimentation et constitue également un test visio-moteur. L'accomplissement de cette tâche semble peu dépendant de l'intégrité de l'hippocampe, mais est plutôt basé sur des processus associatifs (Macedo *et al.*, 2008).

L'utilisation des repères extérieurs est empêchée par le déploiement d'un rideau noir autour de la piscine. Dans cette phase, la souris doit rejoindre une plateforme visible dont la position varie à chaque essai. Quatre essais quotidiens de 60 sec espacés de 45 min sont réalisés sur 2 j. Les paramètres étudiés dans cette phase sont la latence à rejoindre la plateforme, la distance parcourue et la vitesse de nage.

- **Phase d'apprentissage spatial.** Cette phase force l'animal à élaborer une carte spatiale permettant d'établir des relations entre les indices et reposant cette fois largement sur le circuit hippocampique. Dans cette phase, la plateforme de position fixe est immergée et les indices extérieurs au labyrinthe sont rendus visibles. Afin d'éviter des biais liés à la préférence spontanée pour l'un des quadrants de la piscine, les groupes expérimentaux sont subdivisés en sous-groupes entraînés chacun sur différentes positions fixes de la plateforme. La phase d'apprentissage dure 5 j, avec 4 essais quotidiens de 60 sec espacés de 45 min. Les positions de lâcher de l'animal sont changées à chaque essai selon une séquence prédéterminée défavorisant l'élaboration de stratégies non spatiales. Les paramètres étudiés sont la latence à rejoindre la plateforme, la distance parcourue et la vitesse de nage. La souris, dotée de capacités cognitives optimales qui lui permettent de mémoriser la tâche, doit normalement nécessiter des latences moyennes qui s'améliorent chaque jour.

- **Phase de restitution.** Cette phase test permet d'évaluer la trace mnésique à long terme persistant 3 j après la fin de l'apprentissage. La trajectoire de l'animal est analysée au cours d'un essai unique durant 60 sec et effectué dans les mêmes conditions que l'apprentissage, avec une différence notable, puisque la plateforme a été retirée de la piscine. La latence de première entrée dans le quadrant de la plateforme, le temps de premier passage et le nombre de passages à l'emplacement présumé de la plateforme, la fréquentation des différents quadrants de la piscine et la vitesse de nage sont les paramètres étudiés.

E. Mesure de la masse grasse

La mesure de la masse grasse des souris a été réalisée à l'aide de l'appareil EM-Scan modèle SA-3000 (EM-SCAN Inc, Springfield, MA). Ce système utilise la conductivité électrique du corps total (CE) qui repose sur le principe des différences de conduction entre les tissus, pour mesurer un index de conductivité utilisé pour calculer les proportions de masse maigre et masse grasse de l'animal introduit dans l'appareil. Il est possible de détecter entre 5 et 30% de masse grasse avec une corrélation de 0,98 avec les analyses chimiques. Chaque animal fait l'objet de deux mesures successives sous faible anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Le calcul final de la masse grasse (MG) prend en compte divers facteurs tels que la taille (T) et la masse corporelle générale des souris (M), selon l'équation suivante.

$$MG = 100 - \left(-3,732 + (0,578 \times M) + \sqrt{2,967 \times (\sqrt{CE \times T})} \right) \div (M \times 100) \div 1,12$$

F. Échantillonnage

1. Dissections et prélèvements tissulaires

La souris est anesthésiée sous une dose létale à l'halothane (Mundipharma, France) dans une hotte d'aspiration attenante aux box d'hébergement. Après décapitation, le sang est aussitôt prélevé par ponction

cardiaque avant de recueillir les différents organes requis pour les études ultérieures et de les congeler aussitôt en microtubes dans l'azote liquide pour les conserver à -80°C . Les deux hémisphères cérébraux sont ensuite disséqués pour prélever les structures hippocampe, cortex frontal, cortex extra-frontal et bulbes olfactifs, ainsi que le cervelet. Toutes ces structures sont aussitôt rincées dans le tampon d'homogénéisation froid immédiatement avant de préparer les synaptosomes à partir de l'hémisphère droit, ou d'en extraire les lipides pour doser les acides gras cérébraux à partir de l'hémisphère gauche.

2. Préparation des synaptosomes

Le protocole de purification des synaptosomes a été développé et optimisé au laboratoire à partir de celui décrit par Fleck *et al.*, (2001). Les structures cérébrales isolées sont homogénéisées à l'aide d'un broyeur de type *Potter* dans le tampon d'homogénéisation (10 mM Tris, pH 7,4, 0,32 M sucrose, 2 mM EDTA). L'homogénat a été centrifugé 10 min à $750 \times g$ et 4°C . Les surnageants récupérés sont remis à centrifuger durant 20 min à $12.000 \times g$ et 4°C . Le culot final, contenant les synaptosomes, est remis en suspension dans le tampon PBS (pH 7,4) et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse.

G. Prélèvements sanguins

Les échantillons sanguins sont prélevés dans la cavité rétro-orbitaire des souris anesthésiées par inhalation d'isoflurane. À chaque prélèvement, un volume total de 100 μL de sang est récupéré par capillarité en utilisant une pipette Pasteur dans un tube en polypropylène contenant 5% d'EDTA et placé sur la glace. Dans les 5 min qui suivent, les prélèvements sont soumis à une centrifugation de 5 min à $12.000 \times g$ et à 4°C , afin de récupérer le plasma dosé immédiatement ou stocké à -20°C pour des analyses ultérieures.

H. Analyses biochimiques

1. Dosage des protéines

La concentration des protéines dans les synaptosomes est évaluée à l'aide du kit BCA (Interchim, France) en suivant les recommandations du fabricant. Le dosage est réalisé en microplaque et l'intensité de la coloration est mesurée à 570 nm. La concentration protéique des échantillons est calculée à partir d'une gamme d'étalonnage entre 25 et 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'albumine sérique bovine (Lowry *et al.*, 1951 ; Smith *et al.*, 1985).

2. Immunoblot

a. Électrophorèse

Les protéines sont séparées en conditions dénaturantes par SDS-PAGE dans un système de migration verticale (Bio-Rad, France) avec des gels de 1,5 mm d'épaisseur. Les échantillons sont préalablement dénaturés pendant 5 min à 95°C dans du tampon de Laemmli (125 mM Tris-HCl, pH 8,0, 4% (m/v) SDS, 10% (v/v) β -mercaptoéthanol, 0,004% (m/v) bleu de bromophénol) (Laemmli, 1970). Le gel est formé d'un gel de concentration à 5% de polyacrylamide en tampon [0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% (m/v) SDS] et d'un

gel de séparation à 8-12% de polyacrylamide, selon la masse moléculaire des protéines d'intérêt, en tampon [1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% (m/v) SDS]. La migration électrophorétique est réalisée en tampon [1,5 M Tris-HCl, pH 8,3, 19,2 mM glycine, 0,01% (m/v) SDS], à 50 V constants dans le gel de concentration et 100 V dans le gel de séparation.

b. Électrotransfert

Une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) est humidifiée durant 30 sec dans le méthanol, puis équilibrée 10 min dans le tampon de transfert (48 mM Tris-HCl, pH 9,2, 39 mM glycine, 1,3 mM SDS, 20% (v/v) éthanol). À l'issue de la migration électrophorétique, le gel est trempé durant 1 min dans le tampon de transfert avant d'être placé au contact de la membrane entre 2 feuilles de papier Whatmann™ imbibées de tampon de transfert. L'ensemble est disposé dans une cellule de transfert liquide (Bio-Rad), au sein de laquelle les protéines migrent du gel vers la membrane sous une intensité constante de 350 mA pendant 50 min (Towbin *et al.*, 1979).

c. Immunorévélation des protéines

Après électrotransfert, la membrane de PVDF est immergée dans la solution bloquante (2 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20, 5% (m/v) lait écrémé en poudre). Après saturation, la membrane est incubée durant la nuit, à 4°C et sous agitation orbitale, en présence de l'anticorps primaire dilué dans la solution bloquante. Après lavages dans [2 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20], la membrane est incubée 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase. La membrane est ensuite lavée et la protéine d'intérêt est détectée et révélée par chimiluminescence (GE Healthcare, France). L'image est aussitôt numérisée, pour permettre l'analyse quantitative par l'évaluation densitométrique de l'intensité des signaux obtenus à l'aide du logiciel ImageJ.

3. *Extraction des lipides cérébraux*

L'extraction se déroule à 0°C. Après dissection, les différentes structures cérébrales sont placées dans des tubes de 50 mL contenant 2 mL d'eau distillée. Les tissus sont alors dissociés à l'aiguille 23G x 1¼'' de 0,6 mm de diamètre interne (Becton-Dickinson). Le solvant d'extraction (chloroforme/méthanol (2:1), hydroxytoluène butylé 0,0015 %) est ajouté et les tubes sont passés au vortex durant 1 min précise, puis centrifugés pendant 10 min à 850 x g. La phase supérieure et l'interface sont éliminées, tandis que la phase inférieure organique est conservée à -40°C jusqu'au dosage.

4. *Dosage des acides gras*

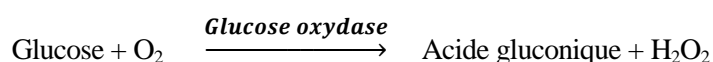
Les AG ont été dosés par chromatographie en phase gazeuse avec le concours des Dr C. Malaplate-Armand et M.-C. Escanyé, dans le service de biochimie du Pr. J.L. Olivier (Hôpital Central, CHRU de Nancy).

Les échantillons sont préparés par transestérification selon Lepage & Roy (1986). Les culots sont remis en suspension dans 100 µL d'un mélange méthanol:chloroforme (2:1), puis dilués dans 2 mL d'un mélange méthanol:dichlorométhane (3:1). Deux cents microlitres de chlorure d'acétyle sont ajoutés à chaque échantillon et les tubes sont chauffés pendant 1 h à 100°C. La réaction de transestérification est arrêtée par l'ajout de carbonate de potassium. Après avoir ajouté de l'hexane et homogénéisé vigoureusement chaque échantillon, le surnageant organique est prélevé et évaporé sous azote. Le résidu sec obtenu est solubilisé dans 25 µL d'hexane. Après injection dans le chromatographe (CP 9001 ; Chromopack, Middelbourg, Pays-Bas) à l'aide d'une seringue Hamilton, les acides gras estérifiés sont séparés sur une colonne DB23 ((50%-cyanopropyl-phényl)-méthylpolysiloxane) de dimensions 30 m x 0,32 mm x 0,25 mm (Agilent Technology ; Massy, France) et analysés après détection par ionisation de flamme. La température de l'injecteur est fixée à 230°C et celle du détecteur à 270°C, tandis que celle de la colonne, initialement à 180°C, augmente progressivement de 5°C/min pour atteindre 260°C et le rester 10 min. La phase mobile est constituée d'un mélange air/H₂ dont le débit est réglé à 30 mL/min. Les différents pics obtenus sont intégrés à l'aide du système d'exploitation de données Millénium (Waters). Les pics sont quantifiés à partir de gammes étalons entre 25 et 100 µg/mL des principaux AG (acides palmitique, palmitoléique, stéarique, oléique, linoléique, α-linolénique, arachidonique, eicosapentaénoïque, docosatétraénoïque et docosahexaénoïque ; Sigma). Les résultats obtenus, représentant la quantité de chaque AG dans le tube, ont été calculés et présentés comme un pourcentage de chaque AG dans l'extrait, en considérant que les dix AG dosés représentent 100%.

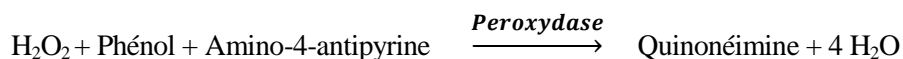
5. Dosages biochimiques et immunochimiques

a. Glucose

Le glucose plasmatique a été dosé à l'aide du kit de dosage enzymatique Glucose-RTU™ (BioMérieux) utilisant la séquence glucose oxydase – peroxydase – chromogène selon un principe en deux étapes.



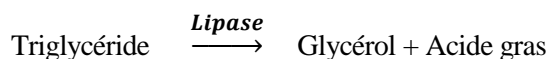
Le peroxyde généré est alors dosé selon la réaction de Trinder impliquant une activité peroxydasique.



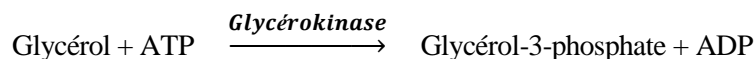
L'intensité de la coloration due à la quinonéimine et proportionnelle au glucose est enfin mesurée à 505 nm.

b. Triglycérides

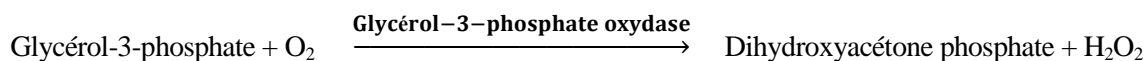
Les TG ont été dosés à l'aide du kit de dosage Triglycérides-RTU™ (BioMérieux). Ce dosage procède en 4 étapes enzymatiques. La première consiste en l'hydrolyse des TG par une lipase.



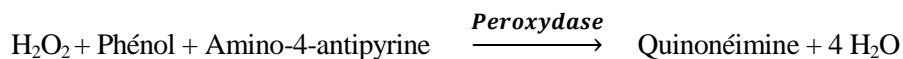
Le glycérol libéré est ensuite phosphorylé par une glycérokinase.



Dans la 3^e étape, le glycérol-3-phosphate formé est oxydé.



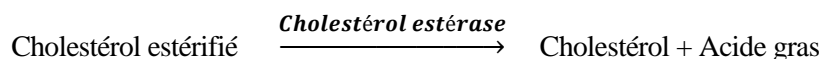
Enfin, le peroxyde produit est dosée de la même façon que le glucose par la méthode de Trinder.



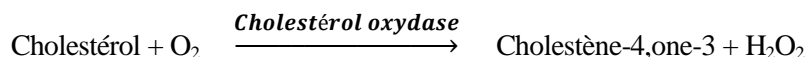
L'intensité de la coloration mesurée à 505 nm est proportionnelle à la teneur en TG dans l'échantillon.

c. Cholestérol total

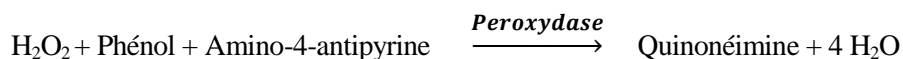
Le cholestérol plasmatique total a été dosé à l'aide du kit de dosage enzymatique Cholestérol-RTU™ (BioMérieux) selon un procédé en 3 étapes débutant par une hydrolyse des esters de cholestérol.



Le cholestérol libre total est ensuite oxydé.



Le peroxyde formé est dosé par la réaction de Trinder, comme le glucose ou les TG.



L'intensité de la coloration mesurée à 505 nm est proportionnelle au cholestérol total dans l'échantillon.

Protocole expérimental. Deux fractions de 2 µL de chaque échantillon plasmatique sont prélevées et déposées en microplaque de 96 puits. Un volume de 200 µL du réactif RTU est ajouté. Après 10-15 min d'incubation à température ambiante, le substrat initial – glucose, TG ou cholestérol – a été complètement transformé par les enzymes du kit, ce qui a conduit à générer la quinonéimine, chromophore dont la concentration est évaluée à partir de l'absorbance mesurée à 505 nm dans un lecteur spectrophotométrique pour microplaque (Biolise). Le dosage est réalisé en parallèle sur un échantillon standard (Unitrol™) de concentration connue (servant à valider le dosage) et sur un calibreur multiparamétrique (Calimat™) dont le titre est de 5,17 mM (2 g/L). La concentration de l'échantillon est calculée par la formule : $[Z]e = (Ae/Ac) * n$, où [Z]e correspond à la concentration de substrat dans la fraction plasmatique à doser, Ae et Ac à l'absorbance de l'échantillon et du Calimat, et n à la concentration du Calimat.

d. Cholestérol-HDL

Le cholestérol lié aux HDL plasmatiques a été dosé à l'aide de la méthode de précipitation HDL-Cholestérol Précipitant (BioMérieux) selon le principe suivant. Les chylomicrons, ainsi que les lipoprotéines de très faible et faible densité (VLDL et LDL) contenus dans l'échantillon plasmatique sont précipités après

ajout d'acide phosphotungsténique en présence d'ions Mg^{2+} . Après centrifugation, le surnageant contient les lipoprotéines de haute densité (HDL) dont le cholestérol est dosé selon le principe indiqué ci-dessus.

Protocole expérimental. Deux fractions de 10 μ L de chaque surnageant sont prélevées et déposées en microplaque de 96 puits. Un volume de 200 μ L du réactif RTU est ajouté. Après 10 min d'incubation à température ambiante, la concentration du chromophore, la quinonéimine, est évaluée à partir de l'absorbance à 505 nm. Le dosage est réalisé en parallèle sur un calibrateur spécifique du kit HDL-Cholestérol Précipitant et de concentration connue. La concentration de l'échantillon est calculée à l'aide de la même formule qu'indiquée ci-dessus pour le dosage des autres composés plasmatiques.

e. Isoformes d'A β et marqueurs inflammatoires IL6 et TNF α

Les concentrations des isoformes d'A β dans les milieux de culture, ainsi que celles d'IL6 et de TNF α dans le sérum sanguin des souris, ont été évaluées à l'aide de kits spécifiques utilisant la méthode ELISA (Engvall & Perlmann, 1971), selon les recommandations du fabricant (RayBio). L'intensité de la coloration a été mesurée à 450 nm.

I. **Dosage du glutathion sanguin**

Un volume précis de 600 μ L de sang prélevé par ponction cardiaque est ajouté immédiatement dans un microtube placé dans la glace et contenant 300 μ L de solution froide d'acide perchlorique à 5% (v/v). Le surnageant, obtenu après 5 min de centrifugation à 13.000 x g et 4°C, est aussitôt recueilli et congelé à 80°C jusqu'à l'analyse. Il contient essentiellement du glutathion érythrocytaire (Begni *et al.*, 2005).

La concentration du glutathion est évaluée après séparation par HPLC en système de partage à polarité de phases inversée (colonne analytique Spherisorb 80-5 ; Waters, St-Quentin-en-Yvelines, France), couplée à un système de dérivatisation post-colonne à l'OPA (*ortho*-phthalaldéhyde) et détection fluorométrique (Modèle Waters 470) de l'adduit GS-OPA (Leroy *et al.*, 1993). Le surnageant acide issu de la déprotéinisation d'un échantillon sanguin est rapidement décongelé dans un bain-marie à 37°C juste avant son injection dans le chromatographe. L'adduit résultant est détecté par la fluorescence émise à 440 nm après excitation à 340 nm et quantifié grâce au logiciel de traitement et d'acquisition de données Millennium (Waters) pour intégrer les chromatogrammes obtenus. Les concentrations de GSH sont calculées par comparaison de l'aire des pics intégrés des échantillons d'une gamme d'étalonnage entre 0,05 et 2 μ g/mL.

Cette procédure permet de doser la forme réduite ou sulfhydryle, mais aussi le glutathion total, ce qui nécessite alors la réduction préalable de la forme oxydée ou disulfure en présence de 7 mM de dithiothréitol et en conditions alcalines durant 20 min à température ambiante et à l'obscurité avant réacidification par dilution au 10^{ème} dans la solution [0,1 M HCl, 2 mM EDTA]. Les teneurs en glutathion oxydé sont calculées en soustrayant le GSH du glutathion total. Le statut redox est lui déduit du rapport GSH/GSSG ou GSH/glutathion total. Tout comme les AG, le glutathion a été dosé dans le service de biochimie du Pr. JL Olivier (CHRU Nancy).

J. Cultures primaires de neurones corticaux embryonnaires de rat

Des rats femelles de la souche Wistar sont introduits dans l'animalerie du laboratoire, agréée par les services vétérinaires, au 14^e jour de gestation en provenance du centre d'élevage R. Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Ces animaux sont maintenus avec accès *ad libitum* à la nourriture standard et à l'eau de boisson, dans des conditions régulées de température ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$), d'hygrométrie ($50\% \pm 5$) et d'éclairage selon un cycle lumière/obscurité de 12 h, ce jusqu'au 17^e jour de gestation, soit durant 72 h.

Toutes les manipulations suivantes sont effectuées en conditions stériles, sous hotte à flux laminaire et à l'aide de matériel stérilisé ou à usage unique. Le protocole utilisé est celui de Pillot *et al.* (1999).

La veille de la mise en culture des neurones, des plaques de 24 puits destinées à la culture cellulaire (Falcon, Becton-Dickinson & Co, Oxnard, CA, USA) sont traitées à l'aide d'une solution aqueuse et stérile de poly-DL-ornithine (Sigma) à la concentration de 15 $\mu\text{g/mL}$. Les plaques sont alors placées dans un incubateur à 35°C , en atmosphère humide saturée en eau et avec 6% CO_2 . En quelques heures, la poly-DL-ornithine forme un réseau polymérique homogène auquel les cellules neuronales dissociées adhèrent en monocouche et demeurent accrochées tout au long de la culture. La solution de poly-DL-ornithine est éliminée juste avant la dissection, les puits étant alors rincés 2 fois à l'eau ultrapure avant d'y introduire une solution PBS/glucose composée de tampon PBS sans calcium ni magnésium (Invitrogen, Réf. 14200-091) contenant 330 μM de glucose. Les plaques sont replacées dans l'incubateur à 35°C en attendant l'ensemencement cellulaire.

Au 17^{ème} jour de gestation, la rate est anesthésiée sous une dose létale d'halothane (Mundipharma, Boulogne-Billancourt, France). Son abdomen est incisé et l'utérus grvide est prélevé. Après libération de leur sac vitellin, les embryons sont immergés dans la solution PBS/glucose et très rapidement décapités. Une incision transversale est alors pratiquée dans la boîte crânienne de façon à dégager le cerveau. Une fois prélevé, ce dernier est immergé dans du milieu de base (Tableau 8).

Tableau 8 : Composition des différents milieux utilisés pour la culture primaire des neurones

Milieux	Composition (ingrédients et concentrations)		Fournisseurs
Milieu de base (pH 7,4)	DMEM (<i>Dulbecco-modified Eagle's medium</i> , Réf. 31600-083)		Invitrogen (Cergy-Pontoise, France)
	Ham's F-12 (Réf. 32500-035)		Invitrogen
	L-Glutamine	200 mM	Invitrogen
	D-Glucose	35 mM	Sigma (St Quentin Fallavier, France)
	NaHCO_3	800 mM	Sigma
	HEPES	100 mM	Invitrogen
	Pénicilline/streptomycine	10 UI/mL	Invitrogen
Milieu complet M2 (pH 7,4)	Milieu de base +		
	Apotransferrine	1,25 μM	Sigma
	Insuline	4,5 μM	Sigma
	Progestérone	20 μM	Sigma
	Putrescine	60 μM	Sigma
	Sélénium	30 μM	Sigma
Milieu de culture (pH 7,4)	Milieu complet +		
	Ovalbumine	20 μM	Sigma

Les hémisphères cérébraux sont séparés, puis débarrassés des méninges et des bulbes olfactifs afin d'isoler le cortex cérébral. Les cortex des différents embryons sont ensuite rassemblés et incubés 5 min à température ambiante, sous agitation lente et douce, dans 20 mL d'une solution Trypsine/EDTA 1X (Invitrogen, Réf. 15400-054) contenant 18,8 μM de trypsine et 6,8 μM d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) dans le PBS. Après décantation, les tissus sont incubés pendant 10 min à 37°C dans 8 mL de milieu de base contenant 2,5% de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen) et 0,06 mg (24 à 48 unités Kunitz) de DNase. Les amas cellulaires sont ensuite dissociés mécaniquement avant d'être centrifugés 5 min à 700 x g. La suspension cellulaire obtenue est lavée 2 fois avec du PBS/glucose (centrifugations de 5 min à 700 x g), avant de remettre le culot en suspension dans le milieu de base. Après homogénéisation de la suspension, la densité cellulaire est estimée par comptage en cellule de Thoma. Les plaques sontensemencées à une densité de $0,15 \times 10^6$ cellules par puits de $1,9 \text{ cm}^2$ de surface renfermant du milieu de culture sans sérum (Tableau 8). Après 48 h dans l'incubateur à 35°C sous 6% de CO_2 , plus de 95% des cellules adhérentes sont de type neuronal.

K. Traitements des neurones en culture primaire

Tous les traitements sont réalisés dans du milieu complet. La chronologie des différentes phases du protocole de traitement des neurones corticaux a été schématisée sur la Figure 50.

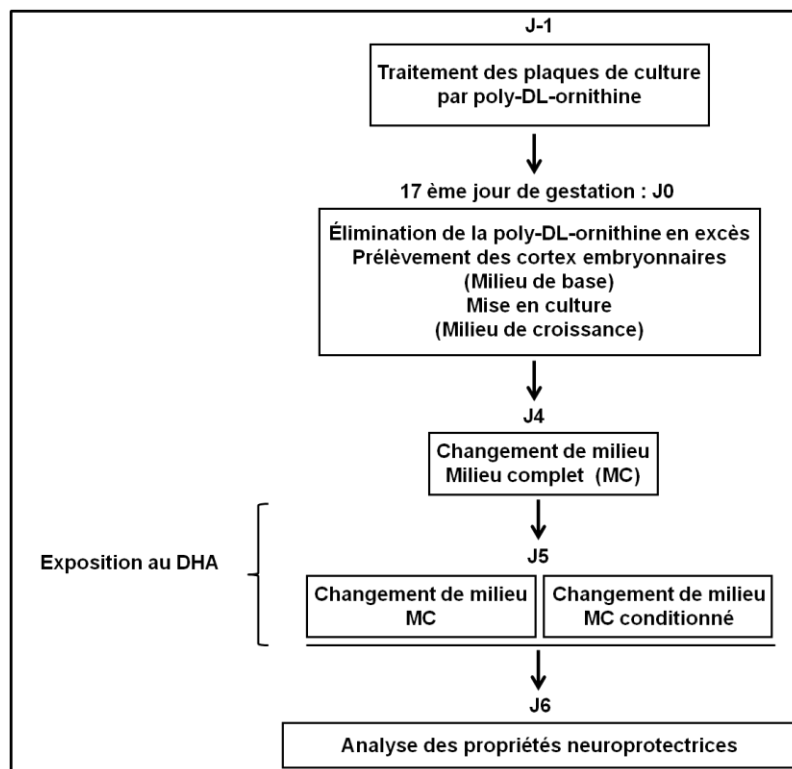


Figure 50 : Évaluation *in vitro* du potentiel neuroprotecteur du DHA

1. Traitements par le DHA

Une solution de DHA est préparée à la concentration de 1 mM dans le diméthylsulfoxyde

(DMSO, Sigma) et conservée à -20°C , à l'obscurité et sous azote, afin de limiter les réactions d'oxydation. Les traitements par le DHA sont appliqués 4 j après la mise en culture des neurones primaires. Des aliquotes de la solution d'AGPI sont prélevées en volume correspondant à une concentration finale dans le milieu comprise entre 1 nM et 10 μM , principalement 1 μM , et introduits dans un microtube. Un volume d'albumine délipidée (Sigma) correspondant à une concentration finale dans le milieu de 0,1% (v/v) est ajouté à l'AGPI et le mélange est homogénéisé au vortex. Le milieu complet frais est finalement ajouté à ce mélange en volume approprié et, après homogénéisation au vortex, est appliqué sur les neurones en culture. La concentration finale de DMSO a été fixée à 0,5% (v/v), concentration n'exerçant aucun effet notable sur la viabilité des neurones. Après traitement, le milieu est éventuellement remplacé par du milieu complet frais contenant le peptide A β ou la solution saline véhicule.

2. Traitements par les oligomères A β solubles

Pour disposer du peptide A β sous forme oligomérique susceptible d'induire une toxicité neuronale appréciable, nous avons utilisé des cultures de cellules HEK293-hAPPwt dérivées de la lignée HEK293 (*human embryonic kidney*) recombinées pour surexprimer la protéine APP humaine sauvage. De toute évidence, les cellules de cette lignée sont équipées des enzymes capables d'induire le clivage amyloïdogène de la protéine APP conduisant au relargage des peptides A β 40 et A β 42.

Après 48 h de culture, le milieu de croissance [DMEM (Réf. 41965-039, Gibco) + 10% (v/v) SVF] usagé des cellules HEK293-hAPPwt est remplacé par le milieu pré-conditionné M2 (Tableau 8) contenant 1% (v/v) de sérum de veau fœtal. Après 24 h de culture dans des flasques de 75 cm^2 placées dans un incubateur à 37°C sous atmosphère enrichie de 5% CO_2 , le milieu est recupéré stérilement dans un tube de 50 mL, puis centrifugé à 13.000 x g durant 10 min pour se débarrasser des éventuelles cellules mortes. Le surnageant est alors utilisé comme milieu de culture contenant l'agent neurotoxique A β et dilué de façon appropriée, sachant que des concentrations respectives de 350 et 20 μM sont mesurées pour les peptides A β 40 et A β 42 dans le milieu M2 conditionné après 24 h de culture, sans toutefois pouvoir préciser la proportion d'oligomères (résultats obtenus avec la collaboration de Julie Colin, doctorante sous la responsabilité des Dr Catherine Malaplate-Armand et Thierry Oster).

Les traitements par les A β Os ainsi obtenus sont réalisés 5 j après la mise en culture des neurones, soit 24 h après le prétraitement éventuel des neurones par le DHA estérifié. Le milieu usagé est éliminé des puits et remplacé par le milieu frais contenant les oligomères A β à une concentration de 30 pM. Ainsi traitées durant 24 h, les cultures de neurones n'ayant subi aucun prétraitement protecteur particulier subissent une perte d'environ 20% des cellules, évaluée par le test d'activité mitochondriale au MTT.

L. Test d'activité mitochondriale au MTT

1. Principe

Le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, Sigma) est un sel dont le cycle tétrazolium peut être clivé par la succinate déshydrogénase des mitochondries actives, formant des cristaux de formazan violets qui précipitent dans les cellules (Mosmann, 1983). La solubilisation de ces cristaux en milieu organique (DMSO) donne une solution colorée dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de cellules métaboliquement actives. Les résultats de spectrophotométrie obtenus sont utilisés classiquement comme indicateurs de viabilité et de prolifération cellulaire, ou *a contrario* de cytotoxicité. Les résultats obtenus par ce test sur les neurones primaires sont bien corrélés avec ceux d'autres tests de viabilité des neurones, comme celui à la calcéine qui explore l'activité des estérases intracellulaires.

2. Protocole expérimental

À la fin du traitement, un volume d'une solution de MTT à 12 mM dans le PBS/glucose est ajouté dans le puits à raison de 10% du volume de milieu de culture. Les cellules sont alors incubées 1 h à 37°C, période durant laquelle des cristaux de formazan apparaissent dans les cellules. Le surnageant est alors remplacé par 150 µL de DMSO de façon à lyser les cellules et solubiliser ces cristaux. Après 10 min sous agitation, 100 µL de la solution de DMSO de chaque puits sont transférés en plaque de microtitration de 96 puits, avant de mesurer l'intensité de la coloration à 570 nm au moyen d'un lecteur de microplaque (Fluostar, BMG LabTechnologies, Champigny-sur-Marne).

M. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. La normalité des données a été vérifiée avec le test de Kolmogorov-Smirnov. Les données suivant une loi normale ont été analysées par des statistiques paramétriques (*t* de Student, ANOVA, test *t* « apparié » et « non apparié »). Les différences sont considérées comme significatives lorsque le risque d'erreur *p* est égal ou inférieur à 5%. La corrélation des rangs Spearman (*rho* de Spearman « ρ ») est étudiée lorsque deux variables statistiques semblent corrélées. Il est basé sur les rangs des données et pas les données elle-mêmes, ce qui le rend insensible aux valeurs éloignées. Cette corrélation est utilisée lorsque les distributions des variables sont asymétriques (statistiques non paramétriques). L'analyse de variance ANOVA à deux facteurs a été utilisée pour analyser l'impact combiné de deux variables et identifier d'éventuelles interactions.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. La supplémentation alimentaire en DHA protège contre le déclin cognitif et préserve les synapses chez les souris modèles de la maladie d'Alzheimer

1. Introduction

La maladie d'Alzheimer (MA), caractérisée par l'apparition de troubles de la mémoire suivis de divers troubles cognitifs et comportementaux, semble débiter par un dysfonctionnement synaptique discret au niveau de l'hippocampe, précédant la mort neuronale par apoptose. Les études menées par notre équipe rapportent une association étroite entre la perte synaptique et neuronale et les propriétés proapoptotiques des oligomères solubles de peptide A β , A β Os (Pillot *et al.*, 1999 ; Sponne *et al.*, 2003 ; Kriem *et al.*, 2005 ; Fifre *et al.*, 2006).

Une littérature importante montre clairement l'implication de perturbations du métabolisme et de la signalisation des lipides dans les phases précoces de la pathogenèse de la MA. Ces molécules assurent en effet des fonctions essentielles, que ce soit en tant que composants structuraux des membranes, en particulier au cœur du fonctionnement synaptique, modulateurs de l'expression des gènes, ou seconds messagers contrôlant la survie cellulaire (Florent-Bécharde *et al.*, 2009). La préservation des fonctions cellulaires nécessite le maintien d'une homéostasie lipidique adaptée aux besoins des individus et modulable selon l'environnement, le terrain génétique et l'âge.

L'acide docosahexaénoïque (DHA) est assurément l'un des acides gras les plus importants dans ce contexte (Oster & Pillot, 2010). Ainsi, les patients atteints de MA semblent présenter des déficits plasmatiques et cérébraux en AGPI, particulièrement en DHA, alors qu'une alimentation riche en DHA pourrait prévenir la survenue de la MA et du vieillissement cérébral pathologique. De plus, il a été déjà montré au sein de notre équipe qu'un traitement par le DHA permet de protéger *in vitro* les neurones primaires corticaux de l'apoptose induite par les A β Os. Il est donc intéressant d'approfondir ces observations en évaluant *in vivo* l'effet préventif potentiel d'une alimentation enrichie en DHA contre ces mêmes agents toxiques, ce qui constitue là l'un des atouts de la technologie que nous avons adoptée. Pour cela, un modèle de souris a été utilisé, dans lesquelles le déclin cognitif est accéléré par injection d'A β Os dans le ventricule latérale, à proximité de l'hippocampe. Ce modèle présente en conséquence une altération des capacités d'apprentissage et de mémoire associée à des perturbations synaptiques.

Nous avons montré *in vitro* l'effet synergique d'une association de cet AGPI à des composés antioxydants ou anti-inflammatoires, permettant de protéger tous les neurones primaires exposés aux oligomères A β solubles (Florent *et al.*, 2006). Associer le DHA à des polyphénols doués de ces propriétés nous est apparu comme une piste évidente qu'il nous faudra aussi explorer *in vivo* pour tenter de potentialiser les effets individuels de chacun de ces agents neuroprotecteurs.

2. Effets induits par le DHA alimentaire sur la cognition et l'intégrité synaptique chez la souris

a. Composition des régimes alimentaires

Dans un premier temps, nous voulions évaluer l'effet d'un régime surchargé en AGPI *n*-6, comme celui rencontré dans le régime occidental, contre les processus de neurodégénérescence et les déficits cognitifs associés au vieillissement et/ou à la MA, et le comparer à celui enrichi en DHA. Cet effet sera évalué dans un modèle de souris mâle C57BL/6J, d'un âge intermédiaire de 40 à 54 semaines (sachant que la durée de vie des souris de cette lignée ne dépasse guère 24 mois), auquel a été administré un régime de valeur calorique identique, enrichi (*n*-6/*n*-3 = 8,4) ou carencé (*n*-6/*n*-3 = 82) en DHA apporté sous forme d'ester éthylique. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle *in vivo*, validé au sein de notre laboratoire, particulièrement pertinent pour évaluer l'intérêt préventif de régimes alimentaires sur les déficits cognitifs modérés caractéristiques des stades précoces de la maladie d'Alzheimer. Ce modèle de souris C57BL/6J sauvage, présentant une altération des capacités mnésiques associée à des dysfonctionnements synaptiques, est obtenu après une injection stéréotaxique unique d'oligomères Aβ solubles dans le ventricule latéral à proximité de l'hippocampe, structure cérébrale essentielle impliquée dans les circuits neuronaux mis en jeu dans les processus de mémorisation (Youssef *et al.*, 2008). Ce modèle *in vivo* a déjà permis de caractériser les désordres synaptiques induits par les AβOs, ainsi que de démontrer l'efficacité d'une approche de thérapie cellulaire neuroprotectrice (Garcia *et al.*, 2010).

Un protocole nutritionnel a été défini, prévoyant de contrôler durant 14 semaines l'alimentation de 48 souris mâles âgées de 40 semaines et réparties au hasard dans deux groupes de 24 souris, ce nombre nous assurant *a priori* la survie d'au moins 20 individus par groupe-régime pour garantir la pertinence et la signification des analyses comportementales prévues à la suite des injections intracérébrales (Figure 51). Deux régimes distincts notés DHA+ et DHA-, tous deux isocaloriques par rapport au régime standard Harlan 2018S, ont été administrés durant 12 semaines avant l'injection intracérébrale, puis lors des analyses comportementales durant les 2 semaines post-injection. De l'eau de boisson, ainsi que le régime servi sous forme de croquettes, ont été proposés *ad libitum* aux souris. La composition des régimes a été établie sur la base de la littérature et de l'expérience des investigateurs (Figure 52).

Les ingrédients nutritionnels ont été incorporés dans la matrice alimentaire directement lors de sa fabrication par la société Safe (Augy, F-89290). La supplémentation en AGPI-*lc n*-3 a été réalisée en intégrant à la matrice du régime enrichi en DHA une quantité de DHA-EE (KD-Pharma, Bexbach, D) telle que la concentration finale de l'AGPI dans l'aliment proposé aux souris soit de 0,3% (m/m). La composition en AG a été déterminée dans l'aliment constitué, ce qui a permis de vérifier la présence effective de 0,24% de DHA dans le régime DHA+, teneur se situant plutôt dans la fourchette basse des régimes utilisés dans les études comparables déjà publiées (jusqu'à 10 fois plus !), alors qu'aucune trace de DHA n'a été trouvée dans le régime DHA-. Signalons aussi que nous voulions qu'aucun de ces régimes ne permette une synthèse de DHA endogène à partir du précurseur ; aussi, nous avons limité les proportions d'ingrédient susceptible d'apporter de l'ALA (C18:3 *n*-3) en quantités significatives.

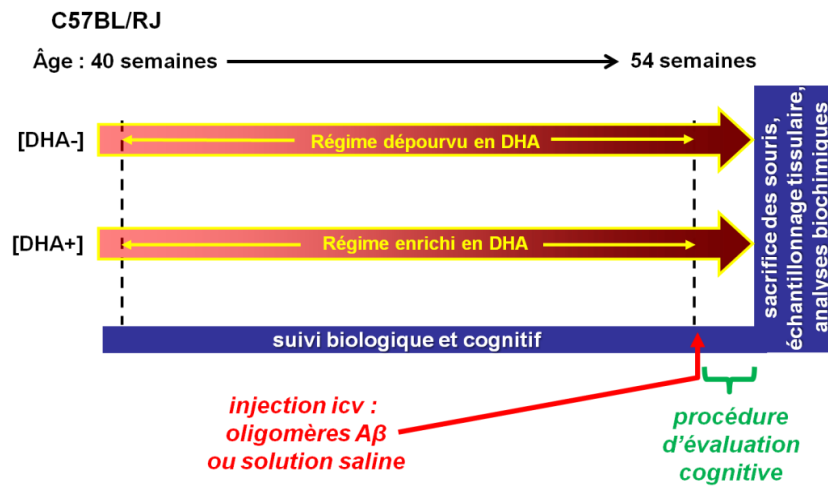


Figure 51 : Programme nutritionnel de l'étude et suivi des souris

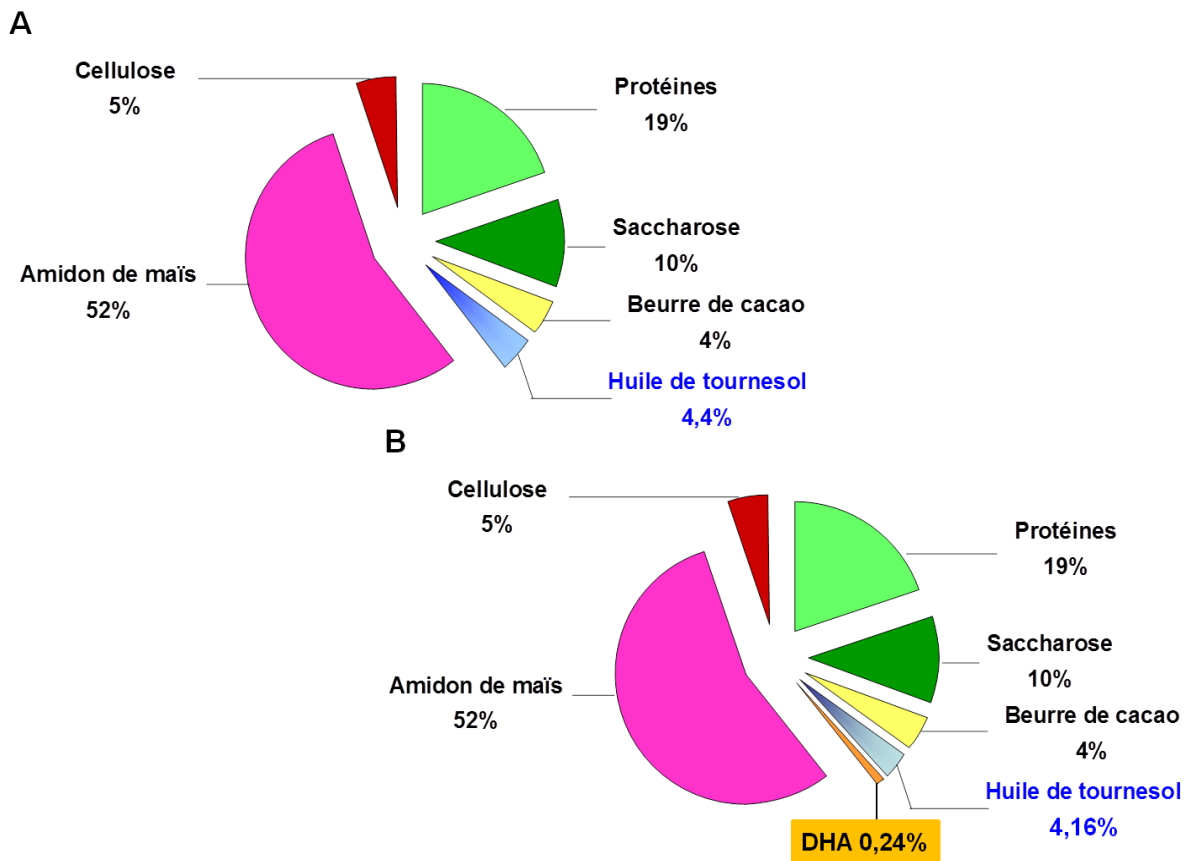


Figure 52 : Composition des régimes alimentaires

A : Régime dépourvu en DHA ; B : Régime enrichi en DHA

b. Paramètres biologiques (prise alimentaire, poids corporel)

Pour des raisons pratiques liées notamment à l'injection intracérébrale et au souci d'avoir à traité dans la même journée un nombre raisonnable d'animaux, l'étude a été fractionnée sur 4 semaines, incluant évidemment dans chacun des groupes-temps des souris des deux groupes-régimes. Cette

organisation nous a permis d'obtenir des résultats qui, après comparaison, sont apparus reproductibles et homogènes, renforçant ainsi la robustesse des conclusions auxquelles ils ont mené. Les souris ont été élevées à raison de deux individus par cage, avant d'être isolées durant les trois dernières semaines, c'est-à-dire la semaine précédant l'injection. Le suivi alimentaire a consisté à placer une quantité définie d'aliment sous forme de croquettes dans la mangeoire de chaque cage et de déduire la quantité consommée en pesant l'aliment restant tous les 3-4 jours. Les souris se sont bien adaptées aux régimes proposés, puisque le suivi de la prise alimentaire, évaluant donc deux fois par semaine la quantité de nourriture ingérée, n'a montré aucune rupture importante avec la période précédant l'étude durant laquelle les souris étaient placées sous régime standard Harlan 2018S. Les résultats de consommation alimentaire ne montrent aucune différence significative entre les souris sous régime dépourvu ou enrichi en DHA. Cependant, la masse corporelle, évaluée une fois par semaine pour chaque souris, a montré une évolution distincte entre les deux groupes sous l'influence de leur régime (Figure 53). Les souris du groupe DHA- ont connu une augmentation de leur masse corporelle de façon régulière et conforme à notre expérience sur ces souris de cette tranche d'âge. En effet, sous régime standard, les souris C57Bl/6J adoptent spontanément et progressivement un phénotype obèse visible dès l'âge de 15 mois et pouvant leur faire gagner en fin de vie plus de 50% de leur poids à 12 mois. Nous avons attribué cette évolution à une forme de vieillissement, vraisemblablement liée à la consommation d'un régime alimentaire inadapté et plutôt optimisé pour l'élevage d'animaux plus jeunes. En tout cas, la comparaison des souris des deux groupes-régimes nous a permis de constater que la masse corporelle moyenne de celles du groupe DHA+ paraît évoluer de façon moins marquée, la prise de poids entre les 2^e et 12^e semaines étant deux fois moins importante (~ 1 g vs. ~ 2 g pour les souris DHA-). Bien que la significativité statistique de cette différence n'ait pas pu être confirmée, cette tendance suggère que l'apport de DHA puisse modérer l'augmentation de poids liée à l'âge sans modification significative de l'apport énergétique. Une supplémentation nutritionnelle prolongée en AGPI-*lc n-3* pourrait exercer un effet anti-surpoids dont il faudra évaluer les paramètres et les conséquences sur les risques des troubles liés au vieillissement.

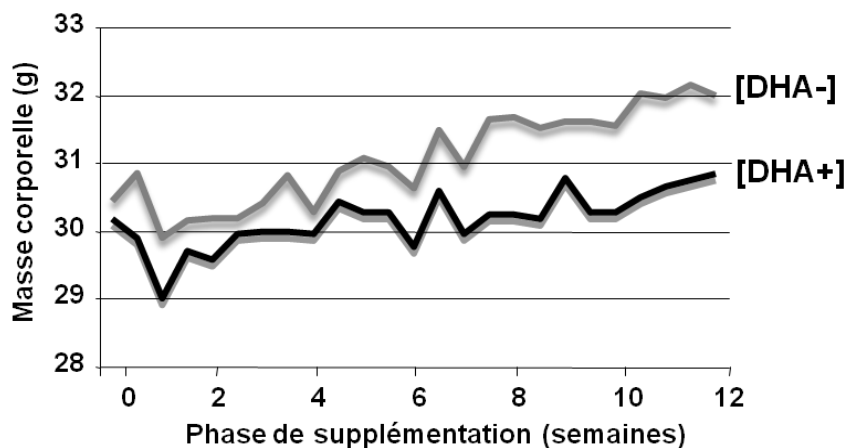


Figure 53 : Évolution de la masse corporelle durant le programme nutritionnel

c. Paramètres plasmatiques (cholestérol, triglycérides, glucose)

Au début et en fin de l'étude, nous avons mesuré les niveaux de différents marqueurs plasmatiques afin de pouvoir visualiser d'éventuels effets métaboliques liés aux régimes administrés. Aucune modification significative n'a été constatée concernant le glucose et les TG plasmatiques à jeun, ce qui ne nous a pas permis de confirmer un éventuel effet hypotriglycéridémiant par le DHA comme de nombreux auteurs l'ont rapporté. Cependant, une nette augmentation du cholestérol plasmatique total a été retrouvée chez les souris sous régime DHA- (Figure 54), suggérant par conséquent l'apparition d'une dyslipidémie qui pourrait expliquer la tendance plus marquée à une prise de poids avec l'âge. En revanche, la supplémentation par le DHA a visiblement pu limiter la dyslipidémie grâce à ses propriétés hypocholestérolémiantes déjà largement rapportées par la littérature (Harris, 1989 ; Holub, 2009 ; Tang *et al.*, 2012).

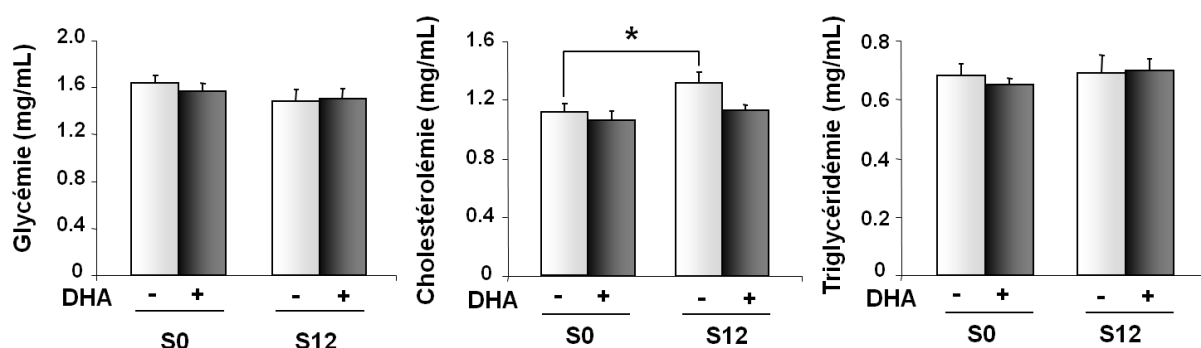


Figure 54 : Bilans plasmatiques avant (S0) et à l'issue (S12) du régime alimentaire

d. Devenir des AGPI-LC n-3 et compositions érythrocytaires en acides gras

Pour étudier l'assimilation des AGPI-lc n-3 pendant le programme nutritionnel, nous avons déterminé les compositions en acides gras des cellules sanguines, dont une part très majoritaire provient des membranes érythrocytaires, dans des échantillons prélevés à T0 et à la semaine 12, c'est-à-dire avant le traitement par les oligomères A β . Les résultats indiquent une nette augmentation des teneurs érythrocytaires en DHA chez les souris supplémentées en DHA (Figure 55). Cette augmentation a été accompagnée de façon claire à une diminution d'ARA. Ces résultats rejoignent ceux de la littérature (Hjartåker *et al.*, 1997 ; Arterburn *et al.*, 2006 ; Dahl *et al.*, 2011). De plus, confirmant la prédominance de ces deux AGPI-lc dans chaque famille d'acides gras, le profil d'évolution des teneurs érythrocytaires relatives en AGPI n-3 variait inversement de celui des AGPI n-6 dont les teneurs relatives étaient augmentées sous régime dépourvu en DHA par rapport aux souris supplémentées en DHA. Enfin, des modifications semblent avoir aussi affecté, plus modestement, les profils d'AGS et d'AGMI érythrocytaires. Les profils d'AGMI montrent néanmoins des modifications nettement marquées (~35% d'augmentation). Ces augmentations sont certainement liées au fait que les deux régimes testés contiennent des huiles végétales, huile de tournesol, riches en AGMI. Les taux d'AGS augmentent de manière beaucoup moins marquée (~5%) Figure 57.

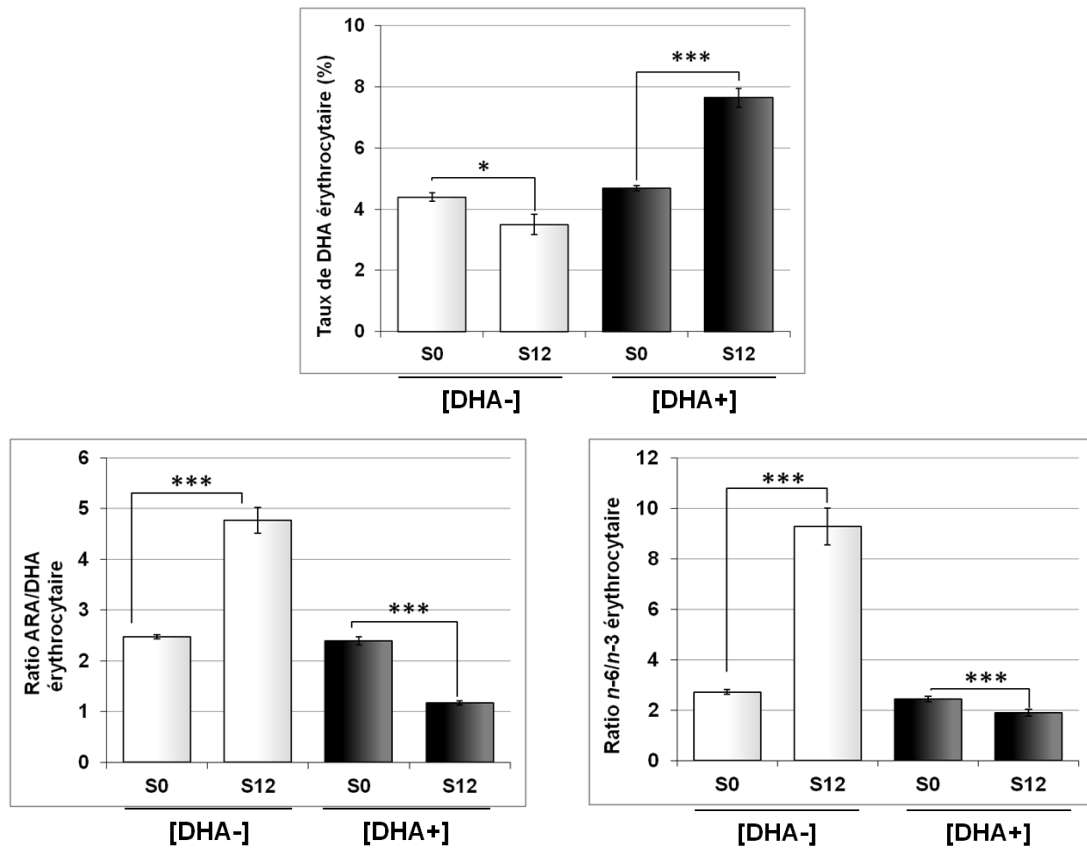


Figure 56 : Évolution des taux de DHA, des ratios ARA/DHA et n-6/n-3 érythrocytaires selon le régime

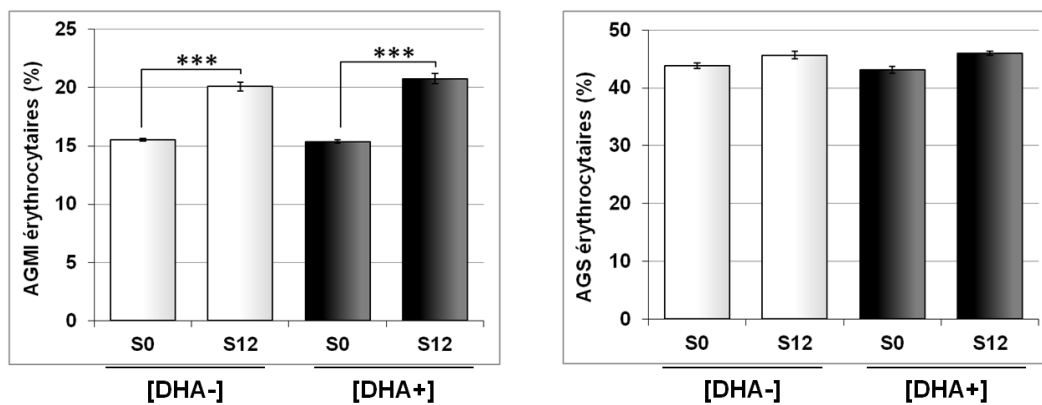


Figure 57 : Évolution des teneurs érythrocytaires en AGMI et AGS selon le régime

e. Stress amyloïde et capacités cognitives

Après 12 semaines, chaque groupe-régime a été séparé en 2 sous-groupes de souris appelées à subir, sous anesthésie et à l'aide d'un dispositif de stéréotaxie, une injection unique dans le ventricule latéral droit du cerveau d'une solution d'oligomères A β solubles en concentration subnanomolaire ou de la solution saline véhicule. Ce modèle est considéré comme un modèle d'altérations précoces de la MA. L'impact du stress amyloïde induit par les oligomères A β solubles est évalué en comparant les capacités cognitives des souris des différents sous-groupes selon un scénario validé permettant l'investigation chronologique de la mémoire à court terme, puis des capacités d'apprentissage et enfin de la mémoire à long terme (Figure 58).

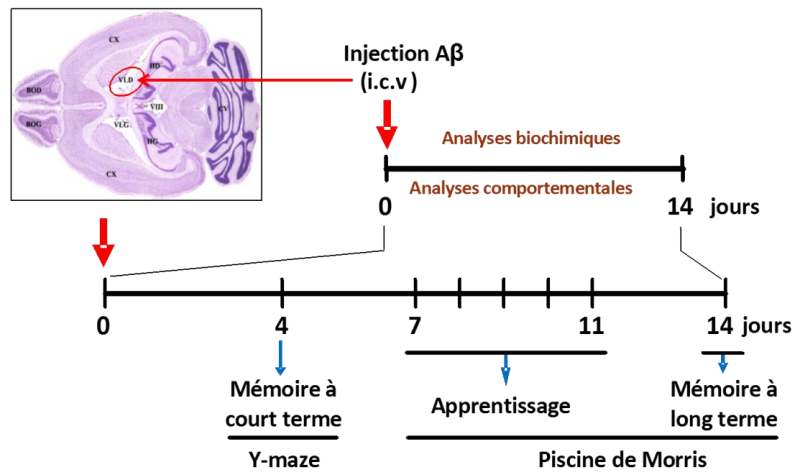


Figure 58 : Scénario d'évaluation des capacités cognitives

Après l'injection ICV, le premier paramètre cognitif évalué a donc été la mémoire à court terme (ou spatiale). Pour chaque régime, les performances des souris ayant subi l'injection d'oligomères A β et le stress amyloïde en conséquence ont été comparées à celles des souris ayant subi l'injection de la solution saline véhicule, dont l'absence d'effet a déjà été vérifiée sur la cognition et sur les protéines synaptiques dont le profil est normalement altéré en réponse au stress amyloïde (Garcia *et al.*, 2010). Nous nous sommes préalablement assurés que la motivation et le comportement des souris n'étaient affectés ni par le régime, ni par la nature de la solution injectée en ICV et nous avons pu vérifier que le nombre de bras du dispositif en Y explorés par la souris durant le temps du test n'était pas significativement différent entre les 4 sous-groupes (Figure 59). Les résultats obtenus permettent surtout de constater que suite à l'injection des A β O, les souris ayant bénéficié du régime enrichi en DHA présentent des capacités de mémoire à court terme qui n'ont pas été altérées et qui sont donc significativement meilleures que celles du groupe-régime DHA- chez qui l'exposition aux A β O a visiblement induit un stress amyloïde qui a affecté le potentiel mnésique des souris (Figure 59).

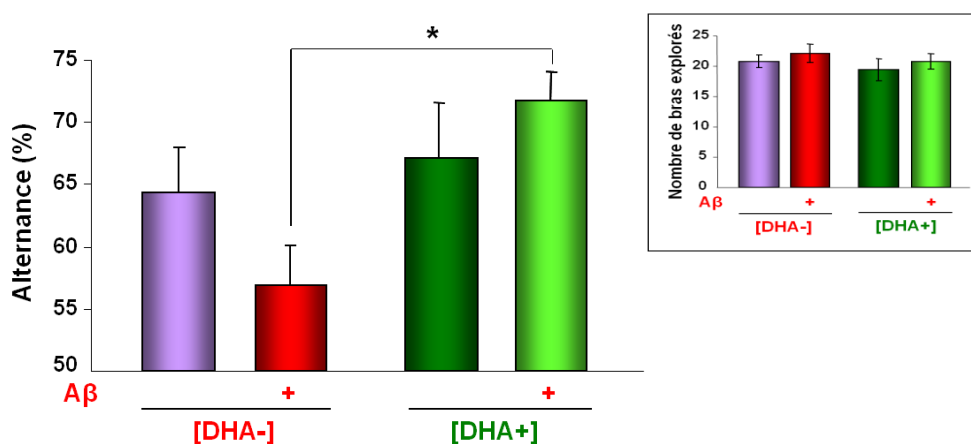


Figure 59 : Protection de la mémoire à court terme par le DHA

Graphique principal : effet des régimes sur la mémoire à court terme ;
en insert : étude de la motivation exploratrice des souris dans le labyrinthe en Y

Ces premiers résultats confirment donc bien la neurotoxicité des oligomères A β et leur capacité à induire des déficits cognitifs, ainsi que l'intérêt d'une supplémentation nutritionnelle en AGPI-LC *n*-3 dans le but de préserver les capacités cognitives et d'augmenter la résistance des neurones au stress amyloïde. Nos résultats sont conformes à ceux de la littérature et confirment l'effet bénéfique des AGPI-lc *n*-3 sur la mémoire (Hashimoto *et al.*, 2002 & 2005 ; Kotani *et al.*, 2006 ; Johnson *et al.*, 2008).

Ensuite, du 7^e au 11^e jour après l'injection (Figure 58), nous avons exploré les capacités d'apprentissage des souris conditionnées à un test contraignant, impliquant la nage forcée en piscine pour trouver une plateforme permettant de s'échapper du milieu liquide, aversif pour les animaux. La latence, correspondant au temps nécessaire pour que la souris trouve la plateforme immergée à l'aide des seuls repères spatiaux, doit normalement diminuer chaque jour, témoignant ainsi que l'animal apprend la tâche et mémorise l'emplacement de la plateforme pour pouvoir y retourner plus rapidement la fois suivante. Les profils d'apprentissage des souris témoins ayant subi une injection de la solution saline véhicule ne paraissent pas différer de façon significative selon les régimes administrés, toutes les souris ayant été globalement capables de rejoindre la plateforme plus rapidement en fin d'apprentissage qu'au début (Figure 60). L'analyse des profils d'apprentissage des souris traitées par les A β O montre une pente similaire de celles des souris sous injection saline pour les souris nourries avec le régime DHA+. Par contre, celles du groupe DHA- présentent un processus d'apprentissage qui semble débiter plus tardivement et avec une pente significativement moins forte que les autres. Ceci reflète un apprentissage plus lent par ces souris, avec des latences qui restent significativement plus longues sur toute la durée de la phase, ce qui conduit à des différences très significatives sur le cumul des latences moyennes de chaque jour (Figure 60). Ceci suggère la présence de dysfonctionnements des réseaux neuronaux impliqués dans les processus mnésiques, induisant en conséquence du stress amyloïde une perte des capacités à mémoriser une nouvelle tâche.

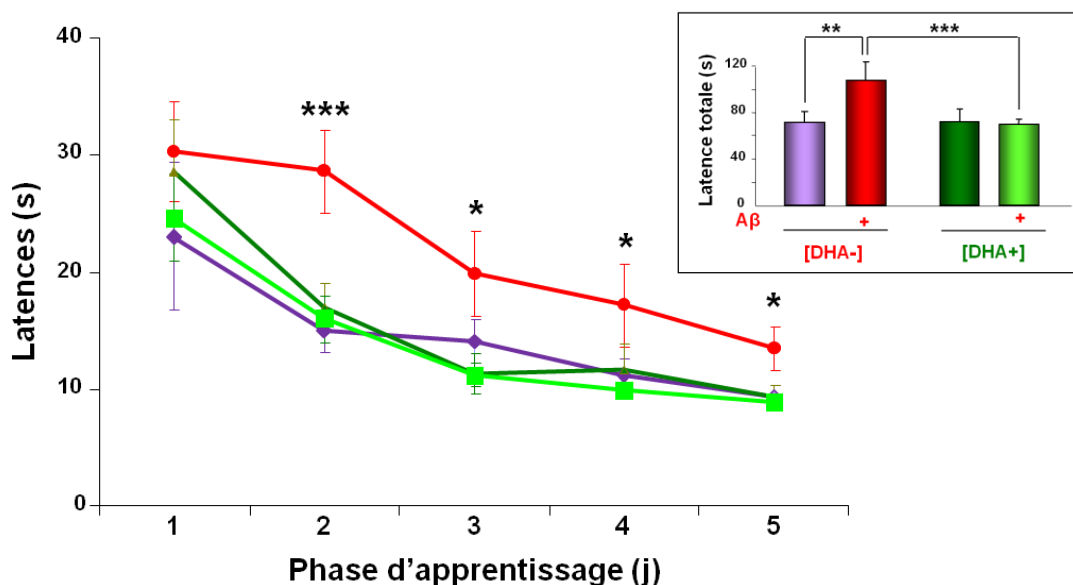


Figure 60 : Préservation de l'apprentissage et de la mémoire spatiale par le DHA

Graphique principal : profils d'apprentissage ; graphique en insert : cumul des latences moyennes des 5 j

L'exploration cognitive s'achève par l'analyse de la mémoire à long terme réalisée par la restitution d'une tâche imposée aux souris 3 j après la fin de l'apprentissage, soit 14 j après l'injection intracérébrale. Ce test consiste à remettre les souris dans la piscine pour évaluer la mémoire à long terme reflétée par leur capacité à rejoindre l'emplacement de la plateforme (qui a été retirée pour les besoins de ce test) et/ou à la rechercher de façon insistante dans le quadrant où elle se trouvait. La mémoire est d'autant meilleure que la gagne rapidement l'emplacement de la plateforme et passe une grande partie du temps disponible (1 min) dans ce quadrant, y croisant donc souvent cet emplacement. Comme pour les autres fonctions cognitives évaluées, seules les souris du groupe DHA- exposées aux A β O se distinguent par des capacités mnésiques significativement affectées par le stress amyloïde. À l'inverse, les oligomères semblent n'avoir induit aucun dégat ni déficit cognitif chez les souris du groupe DHA+ qui conservent des performances et une empreinte mnésique comparables à celles des souris ayant subi l'injection de la solution véhicule, quel que soit leur régime alimentaire (Figure 61). Ces résultats indiquent que les mécanismes neurotoxiques induits par les oligomères A β peuvent effectivement avoir des répercussions à long terme, encore visualisables 14 j après le début de l'exposition. Ceci conforte bien l'idée que la toxicité des oligomères ainsi administrés s'exprime sur la mémoire à long terme ce qui peut être visualisé 14 jours encore après l'injection.

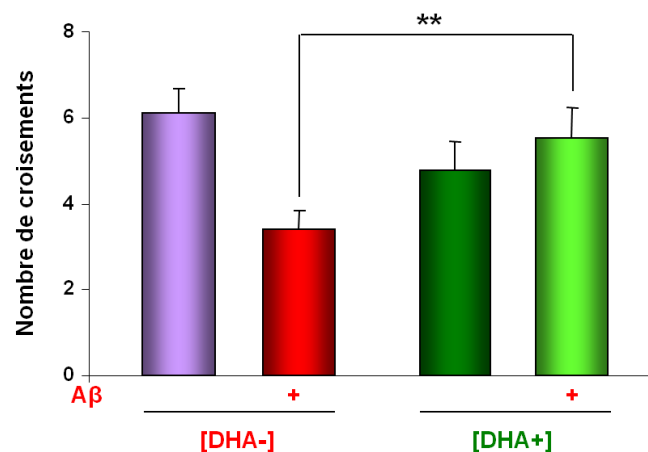


Figure 61 : Protection de la mémoire à long terme par le DHA

Pris dans leur ensemble, les résultats de l'évaluation cognitive montrent qu'un régime supplémenté en DHA apporte aux souris concernées des bénéfices, quantifiables sur la mémoire spatiale dans des conditions de vieillissement pathologique accélérées par un stress amyloïde induit après l'injection intracérébrale des oligomères A β solubles. Les effets neuroprotecteurs attribuables aux AGPI-*lc n-3* consistent en l'amélioration, ou au moins la préservation, des performances cognitives de ces souris en contribuant de manière significative à conserver de façon inaltérée les capacités d'apprentissage et de mémoire à court et long terme. Les AGPI-*lc n-3* d'origine alimentaire semblent donc bien capables d'offrir aux neurones des souris supplémentées les moyens d'une protection totale contre la toxicité des A β O et le développement d'un syndrome de déficit cognitif analogue à celui associé aux phases précoces de la maladie d'Alzheimer. Notons enfin que la carence alimentaire en AGPI-*lc n-3* induite par un régime de 14 semaines dépourvu de

DHA et de ses précurseurs ne s'est soldée par aucune différence significative dans les performances mnésiques des souris après injection de la solution saline véhicule. La demi-vie très longue spécifique de cet AGPI dans le cerveau suggère que la durée de cette carence n'ait pas impacté de façon marquée les teneurs en DHA cérébral, expliquant les résultats comparables des souris des deux groupes-régimes.

f. Analyses biochimiques des structures cérébrales

Les souris ont été sacrifiées sous anesthésie le 15^e jour après l'injection intracérébrale, c'est-à-dire dès le programme d'exploration cognitive achevé, afin d'investiguer l'état des membranes cérébrales le plus tôt possible après les derniers tests. Différentes structures centrales ont été prélevées. Pour chaque souris, le cerveau a été rapidement récupéré avant de séparer les deux hémisphères cérébraux. Les structures de l'hémisphère droit, directement concerné par l'injection ICV, ont été utilisées pour isoler les membranes synaptiques dans la fraction des synaptosomes en vue des analyses protéiques par immunoblot. Les structures de l'hémisphère gauche ont été isolées et immédiatement homogénéisées pour en extraire les acides gras en vue de leur dosage.

i. Acides gras cérébraux

Nous avons étudié l'accrétion du DHA, l'enrichissement en AGPI-*lc n-3* et l'impact sur les AGMI et AGS dans les membranes cérébrales des souris des deux groupes-régimes. La première observation concerne la grande homogénéité des résultats au sein de chaque groupe-régime, avec une très faible variabilité interindividuelle, ainsi que la similitude des profils d'AG entre toutes les structures cérébrales étudiées (Figures 62 & 63). Nous nous sommes focalisés sur l'hippocampe, le cortex frontal et le cortex cérébral extra-frontal, structures impliquées dans les processus mnésiques et les fonctions cognitives. Ainsi, des différences sensibles dans les taux de DHA et les ratios *n-6/n-3* ont pu être constatées entre les souris des deux groupes-régimes. En effet, l'administration d'un régime supplémenté en DHA a permis d'enrichir en DHA les membranes des structures analysées et, arithmétiquement, d'en diminuer significativement ainsi les ratios *n-6/n-3* par rapport aux souris du groupe DHA- (Figure 62). En considérant que la proportion de DHA dans le cerveau des souris sous régime DHA- n'a pas été modifiée dans la durée de l'étude, nous avons calculé que le régime supplémenté en l'AGPI-*lc n-3* n'a enrichi les membranes cérébrales « que » de 20% au maximum, le ratio *n-6/n-3* ayant, lui, baissé de près de 35%. Ceci suggère que les effets protecteurs rapportés ci-dessus et constatés sur les capacités mnésiques des souris exposées aux oligomères A β ne semblent pas nécessiter d'enrichissement spectaculaire en DHA. Cette observation avait déjà été formulée ainsi lors des expérimentations *in vitro* ayant montré une protection maximale vis-à-vis des oligomères A β solubles après traitement de neurones corticaux primaires à des concentrations nanomolaires de DHA n'ayant pas permis de quantifier d'enrichissement membranaire (Florent *et al.*, 2006). Tous ces résultats sont en accord avec la littérature, démontrant qu'un régime enrichi en DHA augmente les teneurs en AGPI *n-3* plasmatique et cérébrale, tout en diminuant celles des AGPI *n-6*, particulièrement l'ARA (Hashimoto *et al.*, 2002 & 2005).

Ils confirment aussi l'intérêt de ces dosages qui, après calcul de l'index Oméga-3 équivalant à la somme [%DHA + %EPA], permettent d'évaluer la qualité nutritionnelle ou l'observance d'un régime, ces teneurs étant bien corrélées aux apports alimentaires (Katan *et al.*, 1997 ; Poppitt *et al.*, 2005 ; Lucas *et al.*, 2009 ; O'Sullivan *et al.*, 2011 ; Lauritzen *et al.*, 2012).

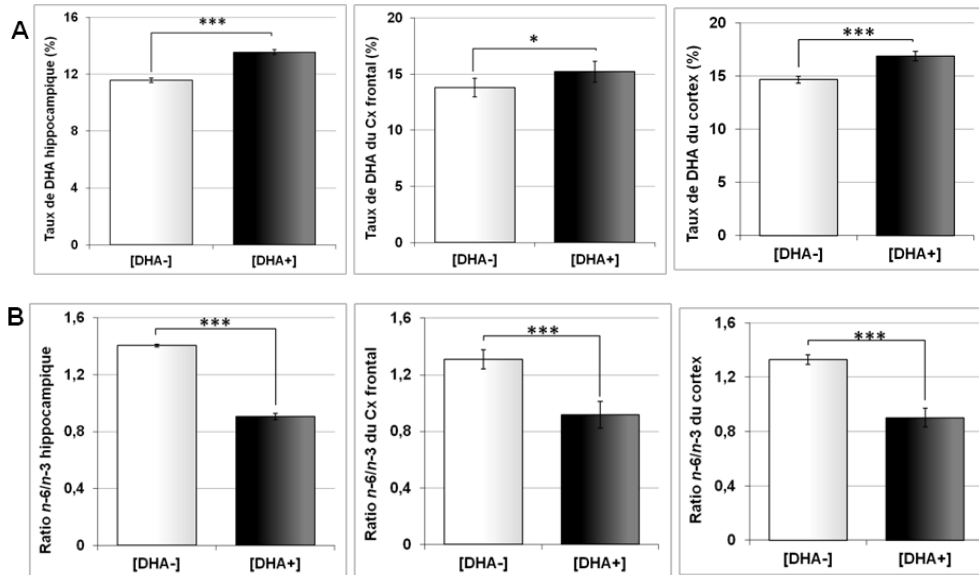


Figure 62 : Influence des régimes sur les teneurs en AGPI dans différentes structures cérébrales

A : Teneurs en DHA ; B : Ratio n-6/n-3

Enfin, l'enrichissement en AGPI-*lc n-3* n'a pas été accompagné de changements notables des proportions en AGS et AGMI (Figure 63). Il faut souligner la grande similitude des résultats sur les différentes structures cérébrales testées, notamment l'hippocampe et le cortex extra-frontal. Ceci suggère que les mêmes processus régulant en particulier la capture et l'incorporation des AGPI-*lc n-3* doivent être fonctionnels et d'une efficacité comparable dans ces structures.

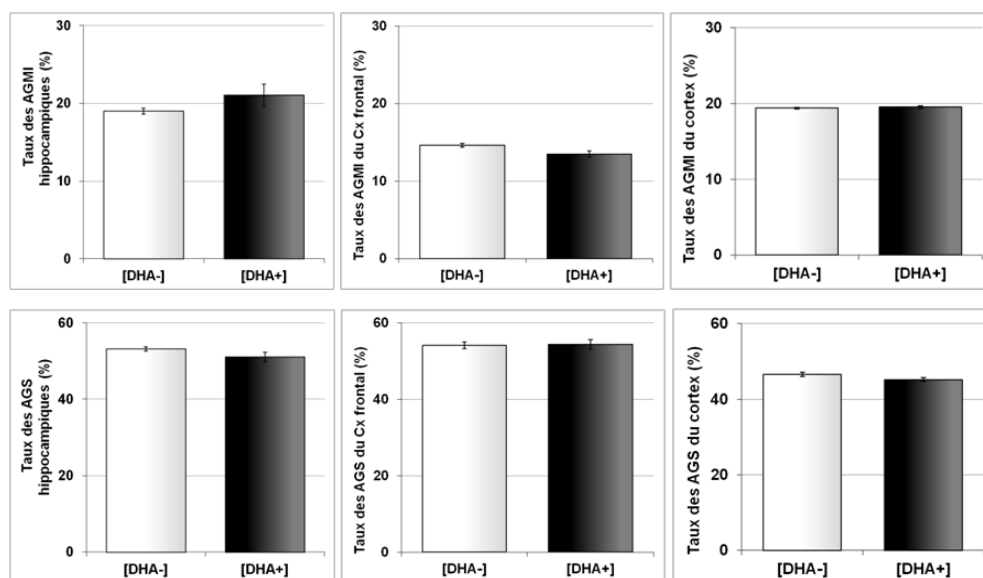


Figure 63 : Influence des régimes sur les teneurs cérébrales en AGMI et AGS

Nous avons aussi identifié des corrélations très significatives entre les teneurs en DHA cérébral et les performances cognitives des souris sous différents régimes et traitements. Ainsi, une association positive significative a été identifiée pour la première fois entre les taux de DHA hippocampiques et les capacités d'apprentissage et de mémoire à long terme de nos souris (Figure 64). Ceci permet effectivement de souligner l'impact majeur des lipides alimentaires, particulièrement le DHA, sur les processus mnésiques et les capacités cognitives.

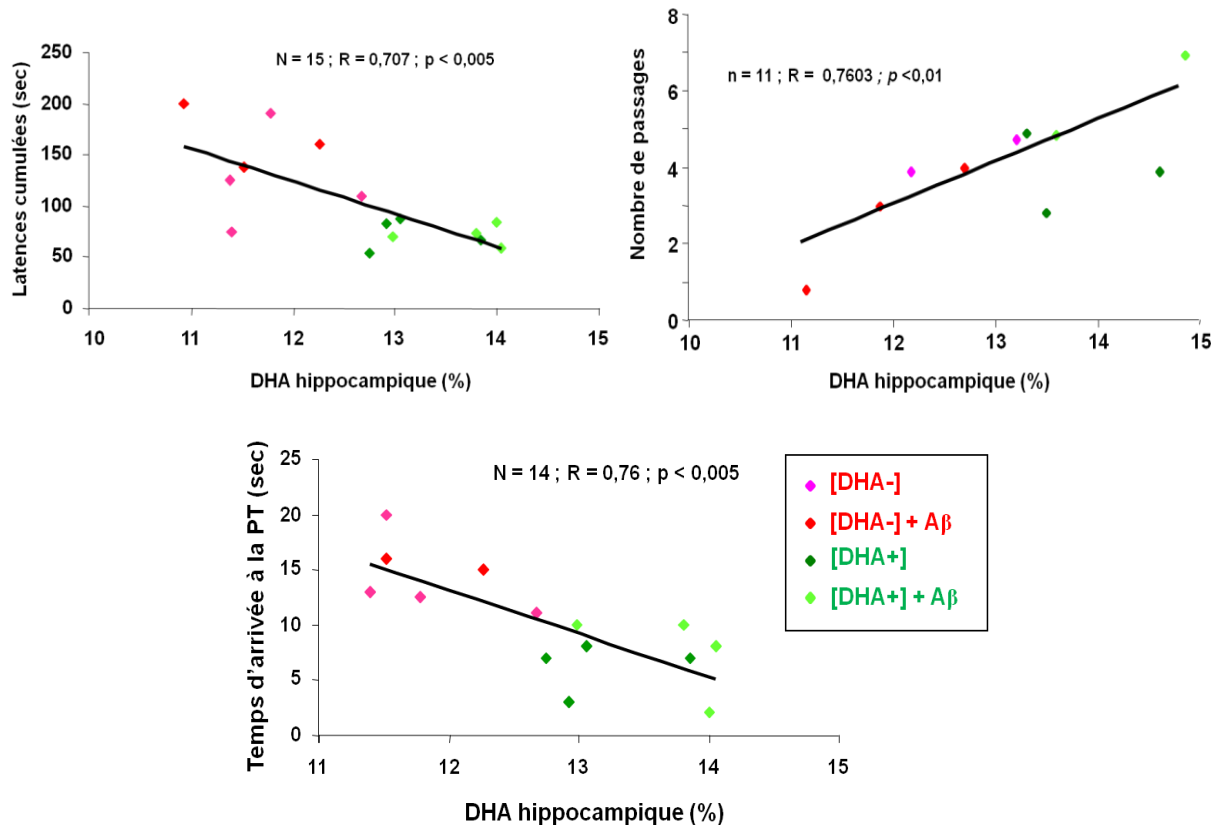


Figure 64 : Relations entre DHA hippocampique et capacités mnésiques

De façon intéressante, nous avons déjà signalé ci-avant une différence au niveau des teneurs en DHA dans les membranes érythrocytaires des souris sous différents régimes alimentaires (Figure 56). Il était donc intéressant de vérifier si les teneurs en DHA dans les érythrocytes étaient liées à celles dans les structures cérébrales. Des corrélations très nettes ont été identifiées, associant d'une part le taux de DHA érythrocytaire ou le ratio des AGPI *n-6/n-3* érythrocytaires et, d'autre part, le taux de DHA dans les différentes structures cérébrales testées, notamment l'hippocampe et le cortex extra-frontal (Figure 65). Ces résultats suggèrent une biodisponibilité importante du DHA dans les différentes structures cérébrales, particulièrement les régions cortico-hippocampiques. Ceci est en accord avec les résultats d'études chez le rat présentés par Hashimoto *et al.* (2002 & 2005). Le profil d'AG érythrocytaire apparaît donc un marqueur représentatif des profils cérébraux, ce que d'autres auteurs ont également avancé. Les taux plasmatiques ou érythrocytaires de ces AGPI-*lc n-3* ont en effet été proposés comme biomarqueurs *in vivo* du métabolisme cérébral et de la neurotransmission, ainsi que comme marqueurs de vieillissement cérébral accéléré avant même l'apparition

des signes cliniques (Rapoport *et al.*, 2011 ; Tan *et al.*, 2012). Mais leur validité reste encore très discutée pour leur utilisation comme marqueurs du risque démentiel de type Alzheimer (Conquer *et al.*, 2000 ; Heude *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2008 ; Holub, 2009 ; Kröger *et al.*, 2009) ou même du risque cardiovasculaire (Hallund *et al.*, 2010 ; Pedersen *et al.*, 2010). En fait, l'une des raisons de ces controverses semble résider sur la nécessité de doser les AGPI, le DHA en particulier, dans des classes spécifiques de phospholipides plutôt que sans distinction (Cunnane *et al.*, 2012). Ces derniers apparaissent comme des marqueurs plus sensibles dont la localisation particulière et le rôle spécifique dans la membrane commencent à être mieux connus aujourd'hui (Igarashi *et al.*, 2011 ; Kawabata *et al.*, 2011).

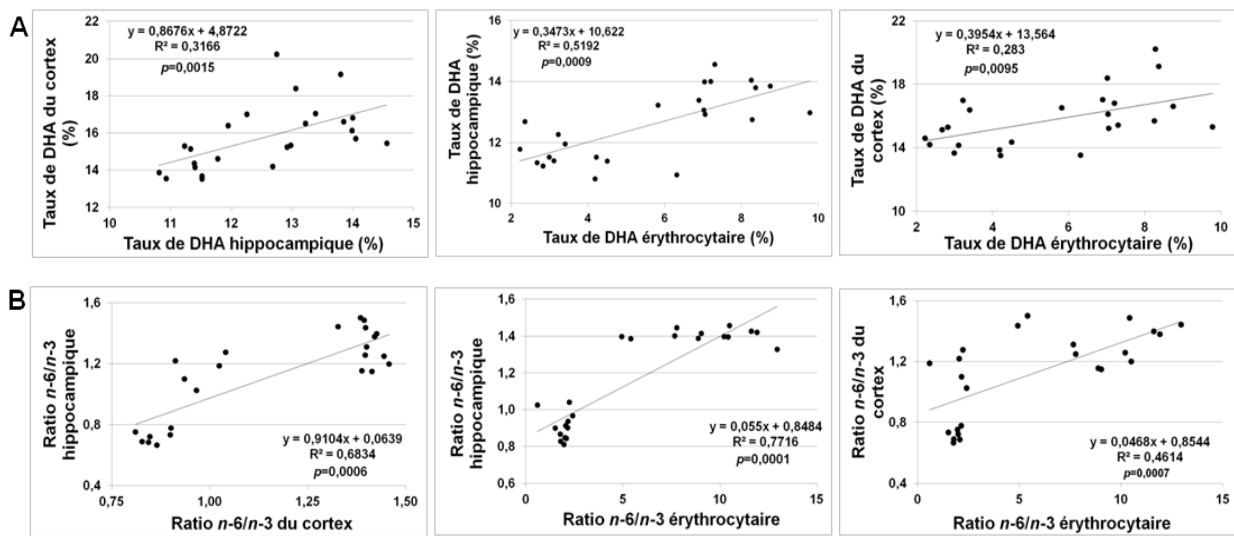


Figure 65 : Corrélations entre les teneurs en AGPI érythrocytaires et cérébraux

A : Teneurs en DHA ; B : Ratio n-6/n-3

ii. Protéines synaptiques cérébrales

En parallèle à la composition en AG dans les membranes cérébrales, nous avons étudié l'abondance relative de protéines particulières dans les fractions membranaires synaptosomales préparées à partir des différentes structures cérébrales isolées dont l'hippocampe et le cortex frontal. Considérant leur intérêt comme marqueurs de l'intégrité des synapses, nous avons choisi les protéines présynaptique SNAP25 (*Synaptosomal-associated protein 25*) et post-synaptique PSD-95, ainsi que les récepteurs post-synaptiques AMPA-R (sous-unités GluR2 et 3) et TrkB-R (*Tyrosine-related kinase B*). La protéine SNAP25 (de 25 kDa) est ancrée à la face cytosolique des membranes neuronales où elle participe avec la syntaxine-1 et la synaptobrevine à la formation du complexe SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*) essentiel pour assurer la fusion membranaire entre les vésicules synaptiques et la membrane plasmique, phénomène nécessaire pour la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Jena, 2011). Ce complexe SNARE, aussi responsable des processus d'exocytose, joue donc un rôle clé dans les fonctions neuronales. L'apparition de la protéine SNAP25 est, comme d'autres protéines synaptiques comme la synaptophysine ou PSD-95, classiquement quantifiée pour suivre l'acquisition du phénotype neuronal durant la maturation cérébrale (Oyler *et al.*, 1991 ; Hepp *et al.*, 2000 ; Bailey & Lahiri, 2006 ; Gottschall *et*

al., 2010). La protéine PSD-95 joue un rôle particulier dans le trafic, ainsi que dans l'adressage aux synapses et la stabilisation des sous-unités NMDA-R (Cousins *et al.*, 2008) et AMPA-R (Bats *et al.*, 2007 ; Mondin *et al.*, 2011) des récepteurs du glutamate, essentiels à la mémoire et à la plasticité synaptique. Enfin, le TrkB-R, le récepteur du BDNF, est impliqué notamment dans la promotion de la survie cellulaire et le support de l'activité synaptique en relation avec les processus d'apprentissage et de mémorisation. Il stimule aussi la croissance dendritique dans l'aire CA₁ de l'hippocampe (Tyler & Pozzo-Miller, 2003) et participe au maintien et au contrôle de la forme des épines dendritiques (von Bohlen und Halbach *et al.*, 2008).

Le DHA incorporé dans les phospholipides membranaires est considéré comme un agent favorisant la fluidité de la bicouche et les phénomènes comme ceux dans lesquelles les protéines synaptiques sont impliquées. Nous avons donc voulu savoir si l'incorporation des AGPI-lc évoquée ci-dessus a des conséquences sur le niveau de ces protéines dans les synaptosomes, structures obtenues *in vitro*, après homogénéisation et fractionnement du tissu cérébral. Elles sont constituées très majoritairement des extrémités neuronales réorganisées en vésicules qui contiennent donc les protéines synaptiques et la machinerie moléculaire requise pour l'exocytose neuronale et la neurotransmission. L'analyse des protéines présentes dans les synaptosomes offre donc un intérêt évident pour apprécier l'organisation et l'intégrité des synapses.

Les profils des protéines synaptiques des synaptosomes du cortex frontal n'ont pas montré pas de modification nette (Figure 66), ce qui peut s'expliquer sur le relatif éloignement de cette structure par rapport au site d'injection, le ventricule latéral droit, plus proche de l'hippocampe. Et de fait, les profils obtenus à partir des synaptosomes hippocampiques apparaissent beaucoup plus cohérents avec les analyses cognitives, avec une chute du taux relatif des protéines SNAP25, AMPA-R et PSD-95 en conséquence de l'exposition aux A β O chez les souris du groupe DHA-, mais pas chez celles du groupe DHA+ (Figure 67).

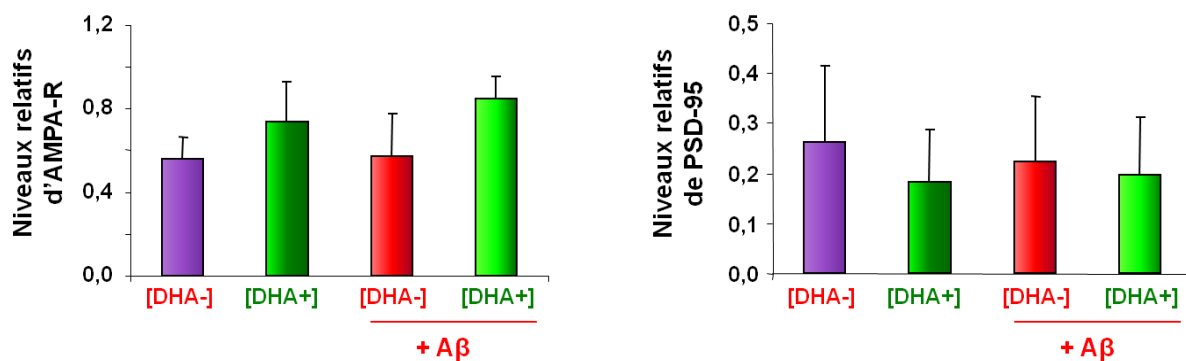


Figure 66 : Effet du régime et du traitement sur les protéines synaptiques du cortex frontal
(*n*=3 par condition)

Les résultats que nous avons obtenus rejoignent les différentes études, dont certaines de notre équipe, qui révèlent que le stress amyloïde induit par les A β O peut induire une cascade synaptotoxique dont l'altération des profils des protéines synaptiques comme SNAP25, PSD-95 et AMPA-R est l'une des conséquences (Gong *et al.*, 2003 ; Lacor *et al.*, 2004 ; Almeida *et al.*, 2005 ; Canas *et al.*, 2009 ; Garcia *et al.*, 2010 ; Desbène *et al.*, 2012). En parfaite cohérence avec les effets sur les performances de mémoire et

d'apprentissage, l'apport nutritionnel en DHA semble avoir préservé l'intégrité des synapses, et certainement leur fonctionnalité, ceci en dépit de l'exposition aux oligomères A β (Figure 67). Ceci tend à renforcer l'idée que l'enrichissement membranaire en DHA puisse modifier les membranes neuronales en les rendant plus résistantes au peptide A β et en évitant que ne se développe un stress amyloïde.

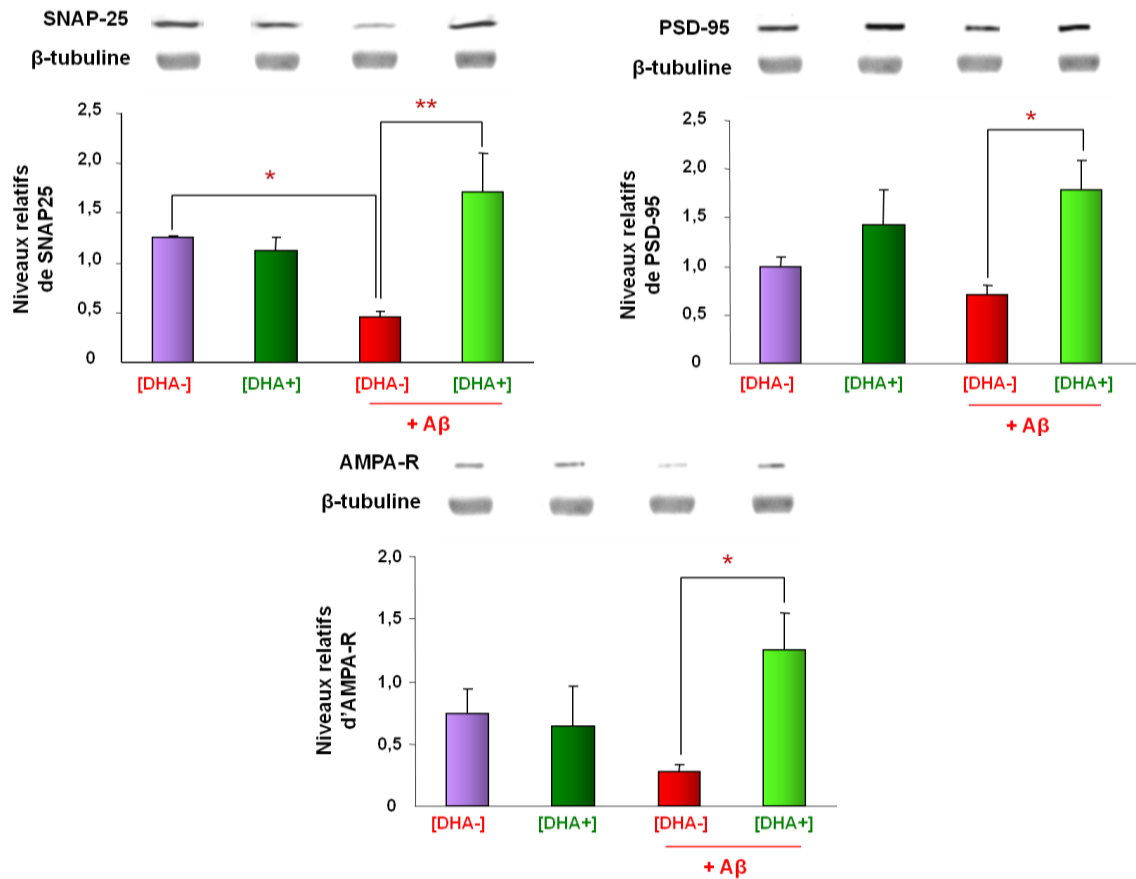


Figure 67 : Effet du régime et du traitement sur les protéines synaptiques hippocampique
(n=3 par condition)

La perte des protéines synaptiques comme le NMDA-R ou PSD-95 a déjà été observée chez des souris transgéniques Tg2576 modèles de la MA (exprimant la forme mutée APPSwe), en conséquence d'une diminution de l'apport alimentaire en AGPI-*n*-3 associée à des troubles comportementaux et cognitifs (Lim *et al.*, 2005). Il faut noter que nous n'avons pas constaté de tels effets sur les souris sauvages, sauf en conséquence de leur exposition aux oligomères A β . Ceci suggère qu'un apport nutritionnel insuffisant en DHA puisse en soi ne pas impacter significativement le fonctionnement synaptique, mais plutôt sensibiliser les neurones à des conditions de stress comme celui induit par le peptide A β . La littérature rapporte que les perturbations observées chez les souris Tg2576, sous stress amyloïde permanent, peuvent être évitées par une alimentation riche en DHA (Calon *et al.*, 2004), ce qui est en accord avec nos observations. Ces résultats suggèrent que les AGPI-LC *n*-3 puissent contribuer à préserver la plasticité synaptique du cerveau, ce qui est conforme aux propriétés synaptogéniques et neurogéniques démontrées pour le DHA (Cao *et al.*, 2009 ; Wurtman *et al.*, 2009 ; Su, 2010 ; Boneva *et al.*, 2011 ; Kim *et al.*, 2011a ; Sakayori *et al.*, 2011).

Croll *et al.* (1998) ont démontré la diminution de l'expression de la protéine TrkB dans l'hippocampe des rats âgés, corrélée avec le déclin cognitif. De plus, l'expression réduite du TrkB a été déjà rapportée dans le cortex frontal et temporal des patients MA (Allen *et al.*, 1999). Plus récemment, il a été rapporté qu'une carence en DHA peut altérer la voie de signalisation BDNF-TrkB, essentielle pour la fonction synaptique, ainsi que pour la plasticité et la survie neuronales (Bhatia *et al.*, 2011). Il a aussi été mis en évidence que les oligomères A β pourraient endommager cette voie de signalisation, *in vitro* comme chez la souris modèle MA (Poon *et al.*, 2011). Nous avons donc voulu déterminer l'effet des A β O sur cette voie. Nous n'avons malheureusement pas réussi à mettre en évidence le BDNF, que ce soit dans sa forme libre dans les surnageants ou liée à son récepteur dans les synaptosomes. Mais nous avons pu observer que la supplémentation en DHA chez les souris exposées aux A β O est associée à une augmentation significative du niveau des protéines Trk et TrkB qui au contraire sont apparus diminués chez les souris du groupe DHA- (Figure 68). Cette diminution, qui a aussi touché les autres protéines testées, pourrait refléter une désorganisation générale de la membrane synaptique sous l'effet des A β O, représentant l'un des premiers signes de dégénérescence neuronale, ainsi qu'une altération du transport antérograde liée aux perturbations du cytosquelette, contrariant ainsi le trafic des protéines et notamment leur acheminement jusqu'au niveau des synapses. Il convient aussi de s'interroger là à propos de la signification de la tendance à l'augmentation du niveau des récepteurs Trk, comme de celui des autres protéines testées, constatée dans les synaptosomes des souris du groupe DHA+, mais seulement celles exposées aux oligomères A β . Les résultats des figures 66 à 68 montrent assez clairement que l'apport alimentaire de DHA aux membranes neuronales ne semble pas entraîner d'augmentation du niveau de ces protéines dans les synapses des souris ayant subi l'injection de solution saline véhicule, suggérant l'absence d'effet notable du DHA sur leur biosynthèse et/ou leur trafic.

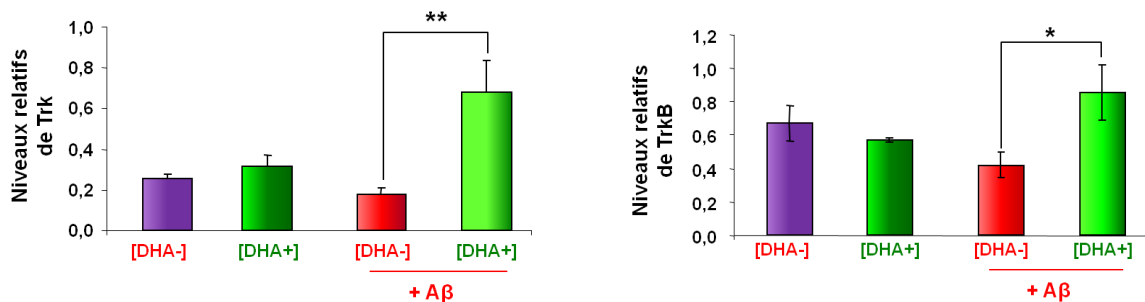


Figure 68 : Préservation des récepteurs à tyrosine kinase hippocampiques
(*n*=3 par condition)

Pour terminer ces analyses des profils biochimiques des structures cérébrales, nous avons recherché la présence de corrélations entre les protéines synaptiques eux-mêmes et entre les protéines synaptiques et les performances mnésiques des souris. Ainsi, comme PSD-95 est impliquée dans le complexe récepteur AMPA du glutamate, nous avons exploré la corrélation éventuelle entre les niveaux relatifs des deux protéines et nous avons identifié une nette corrélation positive dans l'hippocampe. Une autre corrélation a été également identifiée entre SNAP25 et PSD-95 (Figure 69), démontrant bien que l'état d'intégrité des synapses repose fort logiquement sur des niveaux équilibrés de protéines pré- et post-synaptiques. D'ailleurs, ces deux marqueurs, tout comme TrkB, sont corrélés clairement et de façon positive aux capacités d'apprentissage et

de mémoire à long terme (Figures 70 & 71). Ceci permet de conclure que les membranes synaptiques, significativement altérées par les oligomères A β , ont été préservées par un régime alimentaire riche en DHA.

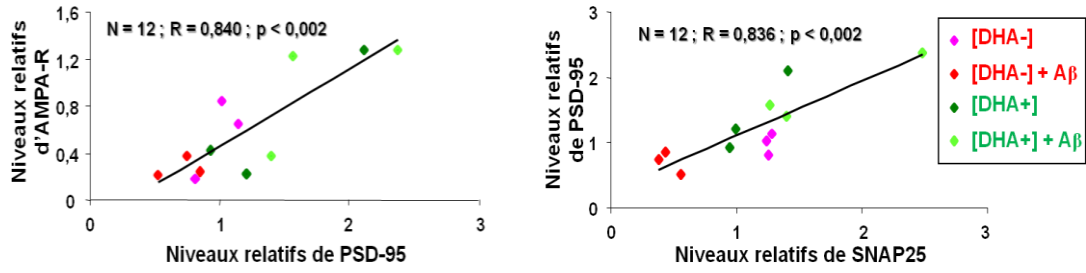


Figure 69 : Corrélations entre les marqueurs synaptiques hippocampiques

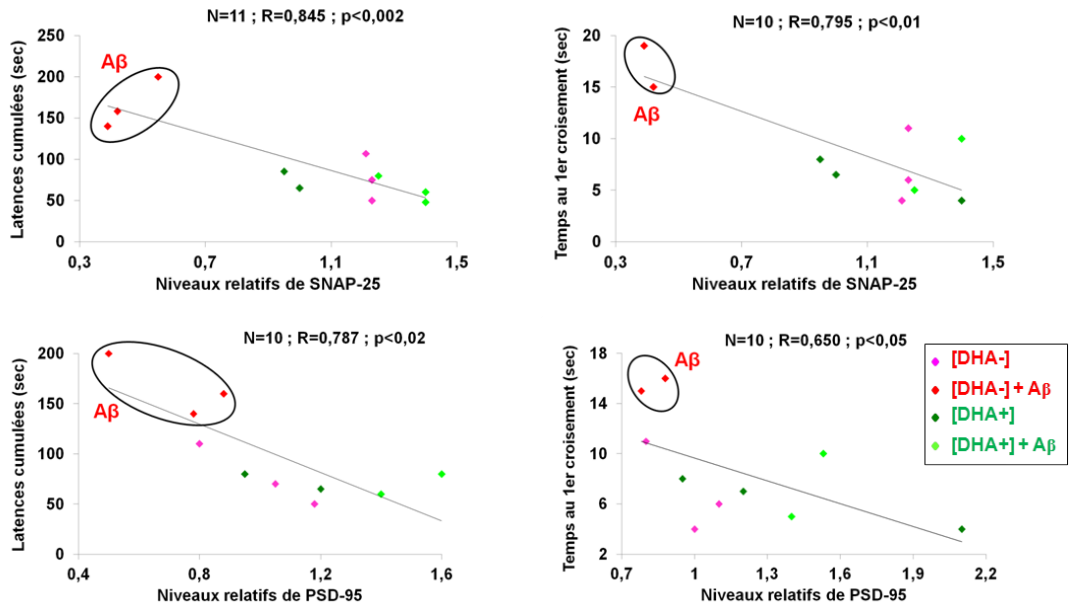


Figure 70 : Corrélations entre marqueurs synaptiques de l'hippocampe et capacités mnésiques

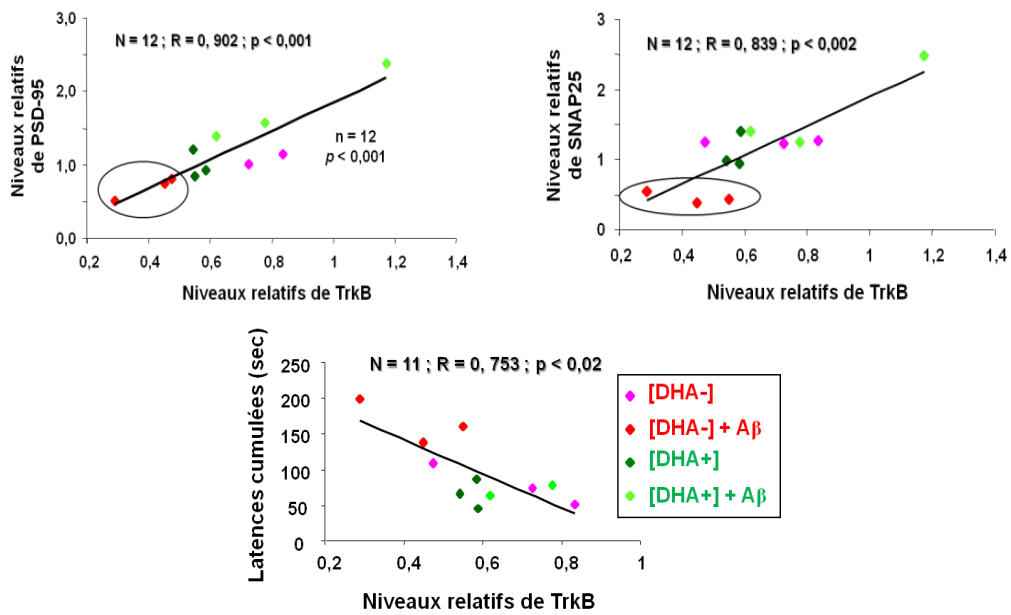


Figure 71 : Corrélations entre TrkB et marqueurs synaptiques hippocampiques ou capacités d'apprentissage

Enfin, même si aucune différence significative n'a été remarquée dans les profils des protéines synaptiques du cortex frontal, des associations significatives et positives ont été identifiées, corrélant aux niveaux relatifs d'AMPA-R les taux de PSD-95 et les performances de mémoire à court terme (Figure 72).

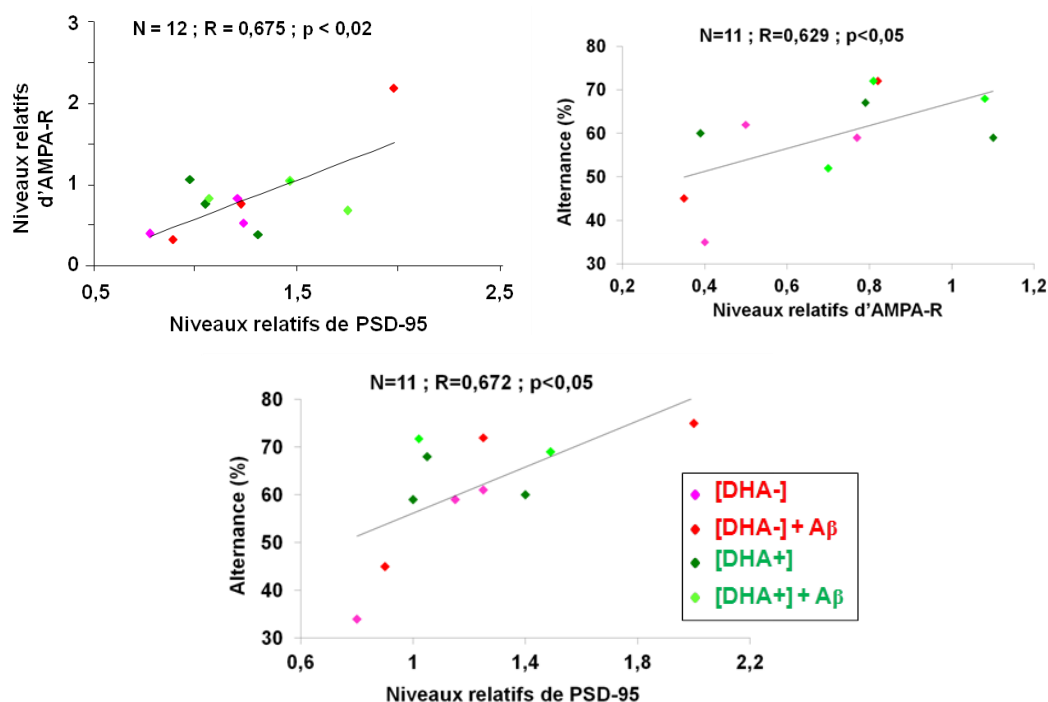


Figure 72 : Corrélations entre marqueurs synaptiques du cortex frontal et mémoire à court terme

Ces résultats soulignent de manière très apparente l'impact déterminant des lipides alimentaires, particulièrement les AGPI *n*-3, sur l'organisation et l'architecture des membranes synaptiques en lien avec la fonctionnalité des processus associés aux fonctions cognitives.

Une étude complémentaire à celle-ci, plus courte cependant menée sur deux durées de 15 et 30 j, a été réalisée en soumettant 20 souris C57Bl/6J mâles chacun, âgées de 15 semaines cette fois au lieu de 40, à un régime alimentaire standard, le régime Harlan 2018S, ou enrichi de 0,24% (m/m) en DHA sous forme d'ester éthylique (Figure 53). À la fin du programme nutritionnel, chaque groupe-régime était séparé en deux sous-groupes de souris appelées à subir une injection unique dans le ventricule latéral droit du cerveau de la solution d'oligomères A β solubles ou de la solution saline véhicule. Lors de la procédure d'évaluation cognitive étalée durant deux semaines et identique à celle de l'étude de trois mois (Figure 58), les souris sont restées sous leur régime respectif. Que ce soit à propos des capacités cognitives ou des profils biochimiques des synaptosomes cérébraux, les résultats obtenus à l'issue de cette étude courte sont tout à fait comparables à ceux de l'étude longue qui s'en trouvent ainsi confortés. Nous ne présentons ici que les profils des AG érythrocytaires et cérébraux (Figure 73) pour montrer la chute spectaculaire (environ 75%) du ratio *n*-6/*n*-3 érythrocytaire, consécutive à l'enrichissement en DHA et à la diminution relative du pourcentage d'ARA chez les souris des groupes DHA15 et DHA30. Ces modifications sur les profils d'AGPI-1c ont pu être constatées aussi dans les structures cérébrales

analysées, cortex, hippocampe et cervelet, mais avec une diminution plus modeste (20 à 25% au maximum, *vs.* 35% après l'étude longue), mais proportionnelle au temps de supplémentation (Figure 73). Ces résultats indiquent que l'apport alimentaire en DHA est susceptible d'enrichir significativement les membranes cérébrales dès 15 j après le début de l'étude. L'effet protecteur du DHA vis-à-vis des A β O s semble donc pouvoir s'exprimer rapidement, puisque ces souris DHA+ ont conservé des capacités mnésiques intactes, ainsi que des profils protéiques synaptiques inchangés par rapport aux souris qui n'ont pas été exposées aux oligomères A β .

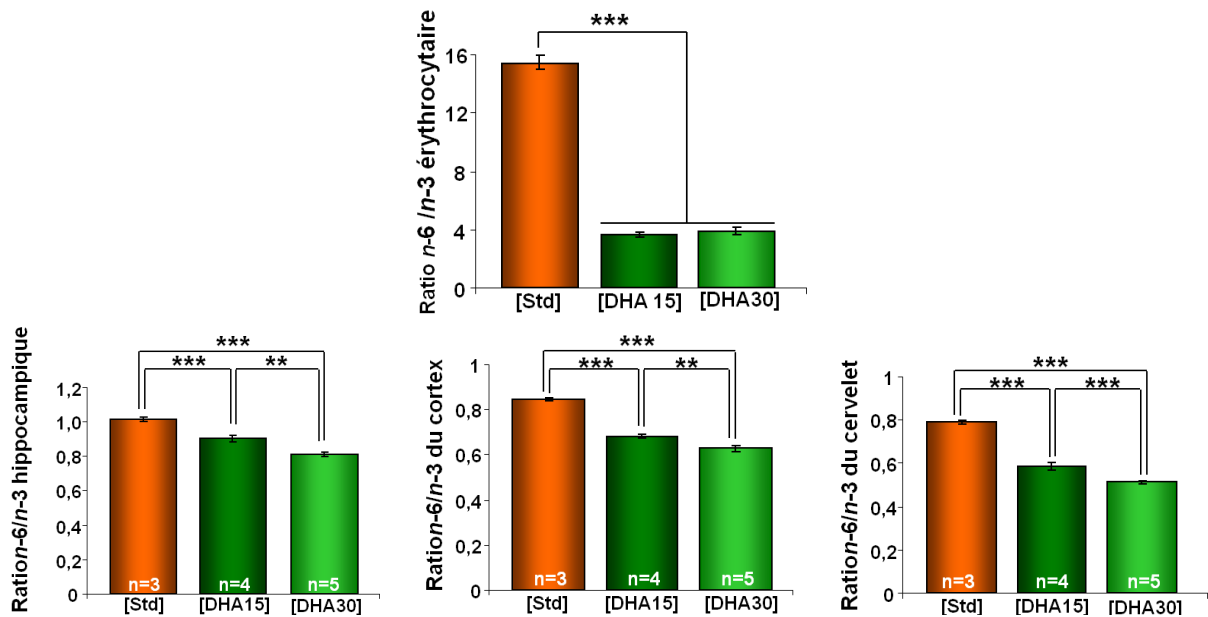


Figure 73 : Influence des régimes sur les ratios d'AGPI n-6/n-3 érythrocytaire et cérébraux

3. Étude préliminaire d'une association entre le DHA et l'alcool vanillique

Nous avons mis en évidence au sein de notre laboratoire qu'un traitement par le DHA permet de protéger les neurones corticaux de rat en culture primaire de l'apoptose induite *in vitro* par les oligomères A β solubles (Florent *et al.*, 2006). À partir des résultats de viabilité obtenus par le test au MTT, nous avons en effet estimé que les A β O s ont induit un taux de mortalité environ 65% plus faible dans la culture traitée par le DHA par rapport à une culture standard. Nous avons aussi observé que l'effet protecteur *in vitro* du DHA ne semblait pas empêcher l'activation de la cPLA₂ et la libération pro-inflammatoire de l'ARA. Mais en associant le DHA à des composés anti-inflammatoires ou antioxydants, nous avons constaté que la viabilité des neurones n'est plus du tout affectée par les A β O s, suggérant une possible neuroprotection synergique. Nous avons alors entrepris d'étudier l'association du DHA à des molécules phénoliques d'origine naturelle, souvent citées pour leurs activités protectrices d'intérêt, pour tenter de potentialiser les effets individuels de chacun de ces composés neuroprotecteurs.

En raison des faibles taux de conversion de l'ALA en DHA déjà évoqués, les besoins des tissus en DHA ne peuvent être couverts que si l'AGPI est apporté en l'état, préformé, par le régime alimentaire qui devient donc la principale source, sinon la seule, de DHA chez l'homme. Cependant, l'AGPI-lc est

une molécule très sensible à l'oxydation, responsable du rancissement des aliments et associée à une perte de leur valeur nutritionnelle et sensorielle. Pour ralentir ce phénomène, l'industrie agroalimentaire est contrainte d'introduire dans ses produits des agents antioxydants, synthétiques ou naturels (vitamines C et E, polyphénols). Associer le DHA à un composé phénolique naturel pourrait donc limiter sa sensibilité à l'auto-oxydation, augmenter la qualité nutritionnelle des aliments enrichis et potentialiser ainsi les effets bénéfiques allégués par des formulations nutritionnelles susceptibles de contribuer à lutter contre le déclin cognitif et le vieillissement cérébral, ainsi qu'à prévenir les démences et la MA.

Dans ce contexte, notre étude s'est attachée à déterminer les propriétés neurotrophiques et neuroprotecteurs d'un composé bimodulaire issu de l'estérification du DHA à une molécule phénolique naturelle, l'alcool vanillique, semblant douée de propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques (Jung *et al.*, 2007 & 2008 ; Rosa *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2011b).

a. Structure et propriétés neuroprotectrices et antioxydantes

L'alcool vanillique (AV) ou l'alcool 4-hydroxy-3-méthoxybenzylique est un composé non flavonoïde dérivé de l'acide benzoïque et de formule chimique $C_8H_{10}O_3$ (Figure 74). C'est le principal composé actif extrait de *Gastrodia elata*, une orchidée d'Extrême-Orient utilisée en médecine traditionnelle pour ses vertus anticonvulsivantes (Jung *et al.*, 2007).

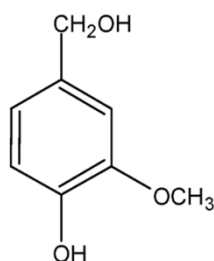


Figure 74 : Structure chimique de l'alcool vanillique

Des études récentes menées *in vitro* et *in vivo* ont révélé un effet neuroprotecteur et antioxydant de l'AV ou de ses métabolites. Les effets observés semblent indiquer que ces composés neuroprotecteurs peuvent passer la BHE et accéder au SNC. En effet, une supplémentation alimentaire en extrait de *Gastrodia elata* (500 mg/kg/j), administrée pendant deux semaines à la gerbille, réduit significativement l'auto-oxydation lipidique membranaire du cerveau, ainsi que la peroxydation induite par H_2O_2 ou par certains ions métalliques comme Fe^{2+} (Jung *et al.*, 2007). Ces résultats régoignent ceux obtenus par Rosa *et al.* (2008) qui ont montré qu'une pré-incubation pendant 2 h des cellules Vero (isolées à partir de cellules épithéliales de rein extraites du singe) avec l'AV pourrait protéger contre les dommages oxydants et préserver les taux d'AGPI totaux et du cholestérol. De plus, il a été montré que le traitement par l'AV ou l'extrait de *Gastrodia elata* augmente considérablement la viabilité des cellules MPTP⁺ MN9D, modèles de maladie de Parkinson (lignée cellulaire neuronale produisant la dopamine et traitée par le MPTP (1-méthyle-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine), une neurotoxine produisant le tableau

clinique de la maladie de Parkinson en détruisant certains neurones de la substance noire du cerveau). Cette protection cellulaire repose sur la diminution de la production d'ERO, ainsi que sur les effets anti-apoptotiques liés à la baisse du ratio Bax/Bcl-2 et de la protéolyse des poly(ADP-ribose)polymérase, (Kim *et al.*, 2011b). Par ailleurs, le traitement par l'extrait de *Gastrodia elata* protège de façon claire les cellules de neuroblastome IMR-32 contre la mort neuronale induite par le peptide A β (Kim *et al.*, 2003). Dans ce contexte, Mishra *et al.* (2011) ont rapporté qu'une supplémentation en extrait de *Gastrodia elata* (2 g/kg/j) durant 2 mois peut améliorer les capacités d'apprentissage et de mémoire chez la souris. En plus, le traitement par l'extrait de *Gastrodia elata* des cellules de neuroblastomes de souris (N2a) ou des TAF-PC12 (cellules de phéochromocytome PC12, transfectées avec la protéine de fusion TAF obtenue par la combinaison de TNFR1, APP770 et GFP) réduit l'amyloïdose cérébrale et favorise la voie non amyloïdogène en inhibant l'expression de BACE1 et en activant l'enzyme α -sécrétase. Une étude plus récente réalisée par la même équipe a révélé une stimulation de la différenciation neuronale et de la croissance des neurites suite à un traitement des cellules N2a par l'extrait de *Gastrodia elata* (Manavalan *et al.*, 2012). Grâce à une analyse protéomique quantitative, ces auteurs ont pu identifier une série de protéines dont l'expression a été induite en réponse à l'extrait de *Gastrodia elata*, dont certaines douées d'activités neuroprotectrices et impliquées dans la régulation de la plasticité synaptique et la survie neuronale, ou capables d'inhiber l'expression de protéines de stress, agissant comme des protéines chaperonnes.

b. Neuroprotection par l'ester vanillique de DHA contre le peptide A β

Les résultats préliminaires de notre équipe ayant montré que l'effet neuroprotecteur du DHA vis-à-vis du peptide A β ne semble pas reposer sur des actions anti-inflammatoires ou antioxydantes (Florent *et al.*, 2006), nous avons entamé une collaboration scientifique avec le LIBio, Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (ENSAIA, Université de Lorraine), en particulier avec le Dr Catherine Humeau, pour concevoir des molécules originales combinant le DHA à un composé phénolique naturel au sein d'une même structure moléculaire. Le choix de nos partenaires a privilégié l'alcool vanillique pour les raisons suivantes : (i) il possède des propriétés neuroprotectrices et antioxydantes particulières ; (ii) il suscite de plus en plus d'intérêt en agroalimentaire pour préserver les lipides des aliments (Figuerola-Espinoza et Villeneuve, 2005) ; (iii) issu de la vanilline, essentielle dans de nombreuses applications alimentaires, il confère également l'arôme typique de la vanille. Les effets recherchés *a priori* d'une telle association sont doubles : une protection efficace du DHA contre son oxydation d'une part, une augmentation de la solubilité du composé antioxydant dans les phases lipidiques d'autre part. L'objectif visé est donc bien d'obtenir des molécules actives plus stables et facilement incorporables, donc davantage biodisponibles, et qui puissent exercer une neuroprotection synergique.

La réaction de synthèse a été réalisée par l'équipe du Dr Catherine Humeau (LIBio), selon un procédé enzymatique utilisant une lipase dans les conditions catalytiques de la réaction inverse de celle habituellement considérée (Figure 75).

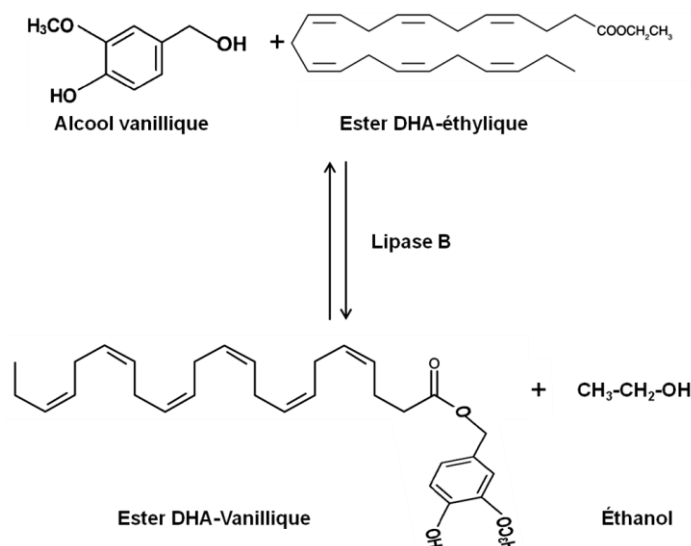


Figure 75 : Réaction de synthèse enzymatique de l'ester vanillique de DHA

Cette même équipe a mis en évidence que, *in vitro*, dans une matrice alimentaire de type margarine soumise à une température de 150°C pendant 9 h, l'ester vanillique de DHA ou DHA-VE a conservé les propriétés antioxydantes de la composante phénolique isolée, alors que sans surprise, l'ester éthylique de DHA ou DHA-EE s'est avéré totalement dépourvu de cette propriété. Le DHA-VE présente donc le comportement espéré pour enrichir efficacement les matrices alimentaires en AGPI. Il nous incombait alors d'étudier le comportement et les effets du DHA-VE dans les neurones en culture.

Nous avons débuté cette étude en vérifiant l'absence de toxicité du DHA-VE. Pour ce faire, le milieu de culture des neurones corticaux de rat a été supplémenté en ajoutant extemporanément des concentrations croissantes de l'ester en présence d'albumine délipidée. La viabilité cellulaire a alors été suivie par le test MTT explorant l'activité mitochondriale après 48 h. Les résultats obtenus mettent en évidence l'absence de toxicité du DHA-VE jusqu'à la concentration maximale testée, c'est-à-dire 10 µM (Figure 76). À titre comparatif, la viabilité neuronale est affectée pour des concentrations en DHA libre à partir de 5 µM, alors que le DHA-EE est hautement toxique et ne peut être utilisé sur les neurones. Il n'est pas exclu que ces différences puissent relever de la partie phénolique du DHA-VE.

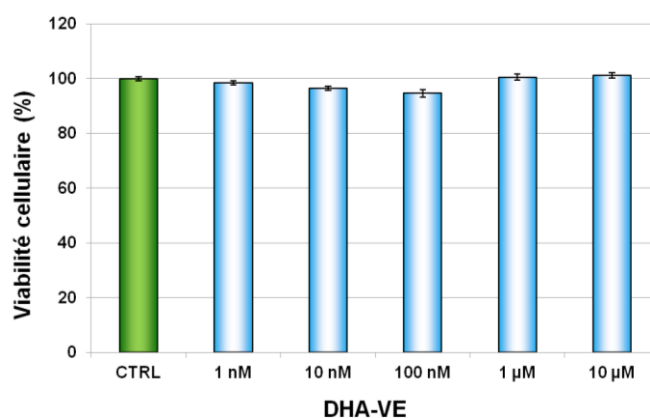


Figure 76 : Étude de la toxicité de l'ester DHA-VE sur les neurones corticaux en culture primaire

Nous avons ensuite comparé le potentiel protecteur vis-à-vis du peptide A β résultant du prétraitement de neurones primaires corticaux de rat par différents composés ou mélanges à la même concentration de 1 μ M dans le milieu de culture : DHA libre, AV libre, [DHA+AV] et DHA-VE. Le peptide A β utilisé pour induire le stress amyloïde a été produit par les cellules HEK293-hAPPwt. Le milieu de culture de ces cellules est recueilli après 24 h et un dosage par ELISA en détermine les concentrations des deux isoformes A β 40 et A β 42, produites en proportions respectives de 95 et 5%. L'incubation des neurones dans le milieu conditionné utilisé à la concentration de 30 pM de peptide A β provoque une diminution nette de 20% de la viabilité cellulaire après 24 h (Figure 77), sachant qu'aucun effet toxique significatif n'a été distingué en traitant les neurones avec le milieu conditionné des cellules HEK293 sauvages ou avec celui des cellules HEK293-hAPPwt cultivées en présence d'un inhibiteur de la γ -secrétase, le semagacestat (résultats non montrés).

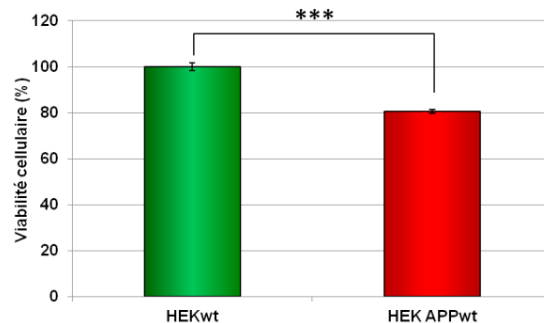


Figure 77 : Viabilité des neurones primaires cultivés dans les milieux conditionnés des cellules HEK293

HEKwt : HEK293 sauvages ; HEK APPwt : HEP293-hAPPwt

Les résultats indiquent que les composés testés ne montrent pas tous la même efficacité à protéger les neurones vis-à-vis des peptides A β (Figure 78). Sachant que les neurones exposés au peptide A β sans prétraitement montrent une viabilité diminuée de 20%, le DHA libre réduit la toxicité à 12%, conformément à notre expérience (Florent *et al.*, 2006), alors que l'AV libre n'a aucun effet protecteur. Les taux de protection les plus élevés semblent avoir été obtenus en prétraitant les neurones simultanément avec le DHA et l'AV. En effet, qu'ils soient ajoutés au milieu de culture libres l'un et l'autre ou combinés sous forme d'ester DHA-VE, leur association semble la plus efficace en diminuant la neurotoxicité du peptide A β de 20% jusqu'à 7%, suggérant que la molécule phénolique puisse potentialiser les effets bénéfiques du DHA. Néanmoins, ces résultats préliminaires doivent être analysés avec précaution, puisque comme le DHA libre, le DHA-VE semble capable d'augmenter l'intensité du signal mesuré par le test au MTT par rapport au contrôle correspondant à la culture neuronale en conditions standards (Figure 78). De toute évidence, l'activité mitochondriale de la culture semble dopée par ces traitements, l'éventualité d'une prolifération n'étant pas envisageable pour des cellules post-mitotiques comme les neurones. Une autre explication semble donc devoir être fournie et il nous faudra la vérifier dans la suite de ces expérimentations. Elle repose sur le fait que la suspension cellulaire préparée à partir du cortex embryonnaire contient non seulement des neurones, mais également des cellules gliales. Les conditions de culture ont été vérifiées être capables de

favoriser la survie sélective des neurones qui sont censés représenter au moins 95% des cellules adhérentes après 48 h. Mais outre la disparition des cellules de type non neuronal, il est vraisemblable qu'une proportion des neurones meure également dans les conditions standards en raison de la relative instabilité inhérente à la culture primaire elle-même. Les propriétés protectrices connues du DHA sous ses diverses formes pourraient donc s'exprimer aussi vis-à-vis de cette mortalité sans A β , en augmentant la survie des cellules, neuronales ou non. Ceci expliquerait bien alors l'augmentation jusqu'à 112% de la viabilité cellulaire observée sous l'effet de l'AGPI seul ou associé à l'alcool vanillique (Figures 78 & 79). Malgré cela, nous avons pu constater que la protection par le DHA vis-à-vis de la neurotoxicité du peptide A β est significativement améliorée par l'association à l'AV (Figure 79). Même reproduits, ces résultats devront être confortés sur notre modèle cellulaire dans des conditions de toxicité par le peptide A β plus marquées afin de mieux visualiser les effets protecteurs des différents traitements.

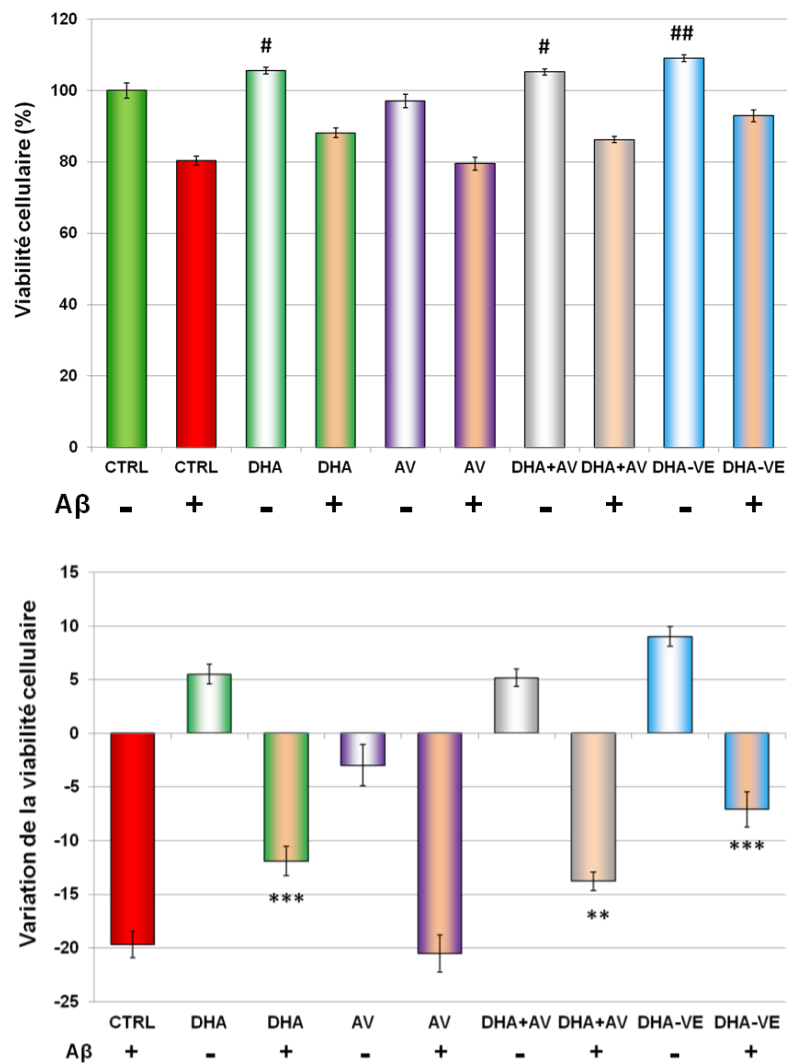


Figure 78 : Effets protecteurs de l'ester DHA-VE vis-à-vis de la neurotoxicité du peptide A β

Les variations de la viabilité cellulaire ont été calculées par rapport aux cultures contrôles (CTRL, A β -). Prétraitement avec les différents composés durant 24 h, exposition au peptide A β durant 24 h, puis mesure de la viabilité cellulaire par le test au MTT (N=3, n=4 ; différence significative vis-à-vis de * A β , ou # contrôle).

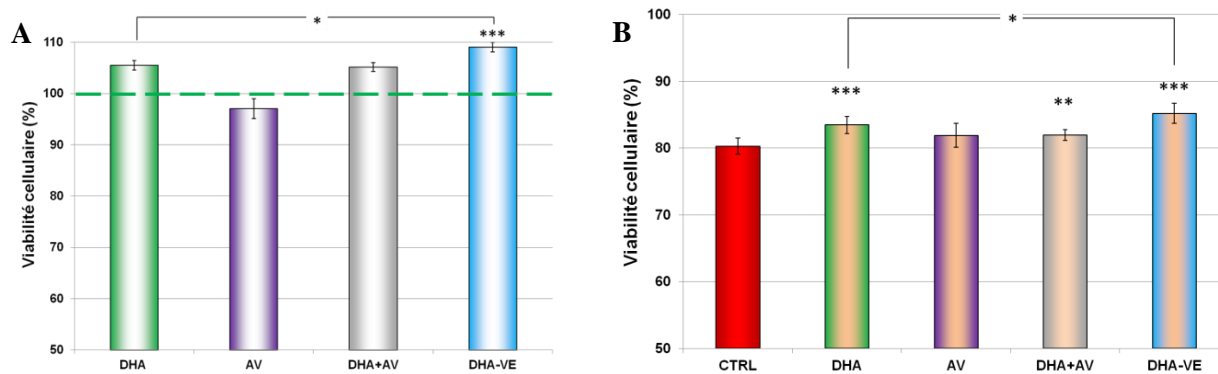


Figure 79 : Effets protecteurs de l'ester DHA-VE sur la culture de neurones primaires

A : Sans exposition au peptide $A\beta$ (les pointillés verts correspondent aux 100% du contrôle).

B : Après 24 h d'exposition au peptide $A\beta$, valeurs rapportées à la culture correspondante sans $A\beta$.

Ces travaux ont été poursuivis par une étude préliminaire *in vivo* destinée à évaluer la biodisponibilité de l'ester DHA-VE comparativement à l'ester éthylique DHA-EE utilisé précédemment. Nous avons défini un programme nutritionnel de 30 j prévoyant d'administrer un régime particulier à 15 souris C57BL/6J mâles âgées de 12 semaines et réparties ainsi : 3 souris contrôle (CTRL) sous régime standard Harlan 2018S ; 12 sous régime supplémenté en DHA, dont 6 par le DHA-EE (0,3%) et 6 par le DHA-VE (0,3%). Les croquettes ont été préparées au laboratoire LIBio par Mohamed Roby, doctorant sous la direction du Dr Catherine Humeau, en incorporant les esters à la matière déstructurée à partir du régime Harlan2018S, puis en reconstituant les croquettes sous flux d'azote afin de limiter les risques d'oxydation.

Le poids corporel et la prise alimentaire ont été mesurés deux fois par semaine, sans remarquer de différence significative entre les trois groupes. Néanmoins, nous avons constaté une légère augmentation de la prise alimentaire par les souris du groupe-régime DHA-VE, ce que nous aurions tendance à expliquer par des croquettes que la teneur en alcool vanillique doit aromatiser de manière plus appétente que le DHA-EE. Chaque souris a subi deux prélèvements sanguins à jeun, réalisés à J0 et J30 pour étudier l'évolution des profils d'acides gras polyinsaturés dans les érythrocytes. À la fin de l'étude, nous avons évalué la mémoire à court terme dans le dispositif en Y, permettant de noter qu'aucune différence dans les résultats mesurés ne permet de distinguer les souris des différents groupes-régimes (résultats non montrés). Les souris ont finalement été sacrifiées sous anesthésie à J30. Différentes structures centrales ont été prélevées pour en doser la composition en acides gras et en composés phénoliques.

Comme nous nous y attendions, les résultats obtenus sur les échantillons sanguins indiquent clairement une augmentation des teneurs des membranes érythrocytaires en DHA chez les souris supplémentées par rapport aux souris contrôles. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les deux groupes-esters, même si les teneurs en DHA semblent supérieures dans le groupe DHA-VE par rapport au groupe DHA-EE (Figure 80). La comparaison des taux de DHA et ARA, ainsi que du ratio ARA/DHA a confirmé cette différence entre les groupes-esters, très distincts de ceux mesurés dans le groupe contrôle sous régime standard. Ces résultats sont conformes à ceux présentés pour l'étude de supplémentation courte (Figure 73).

Il serait évidemment trop hâtif de conclure à une biodisponibilité accrue du DHA lorsqu'il est apporté par supplémentation alimentaire sous forme d'ester vanillique. Il est possible que la prise alimentaire plus importante (mais de façon non significative) ait pu favoriser les taux supérieurs de DHA mesurés dans les érythrocytes, mais l'éventualité que ce DHA associé à l'alcool vanillique ait été ainsi stabilisé et que des concentrations plus grandes aient alors été disponibles ne doit pas être écartée. Quoiqu'il en soit, la présence de la molécule phénolique ne semble pas contrarier la distribution sanguine du DHA vers les autres tissus. L'analyse des AG cérébraux est en cours et ses résultats n'ont donc pu être introduits dans ce document, mais au vu des corrélations significatives identifiées entre les profils d'AG érythrocytaires et cérébraux (Figure 65), nous pouvons raisonnablement espérer qu'elle le confirmera avec des profils semblables. Enfin, le DHA-VE apportant l'AGPI et la composante phénolique en quantités équimolaires, nous pouvons redouter des effets secondaires liés à l'ingestion excessive d'alcool vanillique par rapport aux doses habituellement trouvées et apportées par les sources alimentaires classiques. Aucune évidence d'une éventuelle toxicité liée à la supplémentation en DHA-VE n'a été observée, mais les études à suivre devront en évaluer ce risque de façon plus attentive avant de pouvoir vanter les bénéfices réels de cette association.

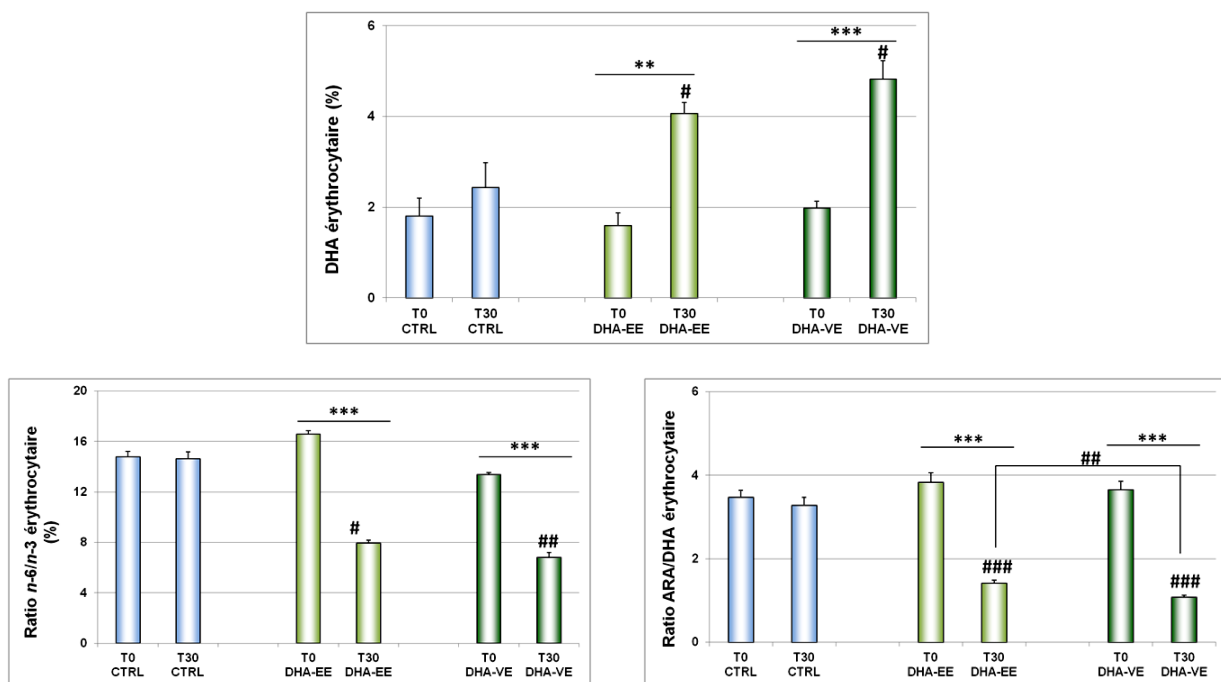


Figure 80 : Influence des régimes enrichis en esters de DHA sur les teneurs érythrocytaires en AGPI

4. Conclusions

Le taux d'incidence des maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer, ne cesse d'augmenter, particulièrement chez les seniors. Outre l'âge qui est le facteur de risque principal, la malnutrition détermine des statuts de rupture de l'homéostasie lipidique de plus en plus fréquemment rencontrés dans les populations occidentales. Malheureusement, les outils diagnostiques et thérapeutiques satisfaisants tardent à s'imposer, malgré les efforts considérables et les moyens déployés pour y parvenir. Il est donc urgent d'identifier les mécanismes impliqués lors des phases précoces et de proposer des stratégies

thérapeutiques/préventives efficaces, notamment nutritionnelles, permettant de résoudre le problème d'une maladie pour laquelle aucun traitement réellement efficace n'existe à ce jour.

Nous avons réussi à mettre en évidence par des études de supplémentation nutritionnelle de souris jeunes ou d'âge intermédiaire, que les AGPI-lc *n*-3 apportés sous forme d'ester éthylique sont parfaitement biodisponibles et capables de contribuer à lutter contre l'altération des performances cognitives. Ainsi, cette supplémentation nutritionnelle indique très significativement que les teneurs en DHA des différentes structures cérébrales (hippocampe, cortex...) sont corrélées aux performances cognitives des animaux, ainsi qu'à la préservation de synapses fonctionnelles après l'injection intracérébrale d'une solution d'oligomères A β en concentration subnanomolaire. Avec une prise alimentaire inchangée, les souris supplémentées en DHA sont aussi apparues comme prenant moins de poids que les souris témoins, avec une diminution significative de la cholestérolémie, ce qui confirme les propriétés du DHA à corriger les dyslipidémies qui sont de plus en plus souvent considérées comme des facteurs de risque du déclin cognitif lié à l'âge. Le modèle animal que nous avons développé dans notre laboratoire apparaît comme un outil particulièrement pertinent pour l'évaluation expérimentale du potentiel neuroprotecteur d'ingrédients ou de préparations alimentaires préventives du vieillissement cérébral et de la MA.

C'est d'ailleurs à l'aide de ce modèle *in vivo*, entre autres, que nous évaluerons l'intérêt et les bénéfices neuroprotecteurs d'une supplémentation en DHA associé à un composé phénolique, après avoir montré *in vitro* les propriétés neuroprotectrices de l'ester DHA-VE issu de la combinaison du DHA et de l'alcool vanillique contre la toxicité induite par les peptides A β . Bien que préliminaire, l'étude *in vivo* que nous avons présentée suggère une biodisponibilité du DHA qui pourrait être améliorée grâce aux propriétés intrinsèques de la partie phénolique de l'ester.

B. Prévenir la dyslipidémie par le DHA peut protéger contre le vieillissement et les pathologies associées (maladies cardiovasculaires, déclin cognitif, maladie d'Alzheimer)

1. Introduction

La maladie d'Alzheimer est une démence progressive qui se manifeste dans ses stades précoces par l'incapacité de former de nouveaux souvenirs. Elle représente une question majeure de santé publique dans les pays occidentaux dont les populations bénéficient d'une espérance de vie qui s'allonge régulièrement. Ce syndrome de déficit cognitif semble débiter par un dysfonctionnement synaptique discret au niveau de l'hippocampe (Stokin *et al.*, 2005 ; Scheff *et al.*, 2007) précédant la mort neuronale par apoptose (Selkoe, 2002). Quoiqu'encore imprécises, les bases moléculaires de cette étiologie impliquent des processus synaptotoxiques et neurotoxiques induits par le peptide A β (Pillot *et al.*, 1999 ; Drouet *et al.*, 2000 ; Haass & Selkoe, 2007). Les propriétés proapoptotiques des formes oligomériques solubles du peptide A β ont été très largement décrites, notamment dans notre laboratoire (Pillot *et al.*, 1999 ; Sponne *et al.*, 2003 ; Kriem *et al.*, 2005 ; Fifre *et al.*, 2006). La perte synaptique est corrélée avec le pool de peptide A β soluble plutôt que fibrillaire dans le cerveau des patients Alzheimer dans lequel les terminaisons synaptiques constituent les cibles des oligomères solubles (Miranda *et al.*, 2000 ; Lacor *et al.*, 2004, 2007). Tous ces résultats apportent une justification clinique évidente à l'hypothèse « oligomères A β solubles » (Tabaton & Piccini, 2005 ; Haass & Selkoe, 2007). Mais les connaissances fondamentales doivent encore être améliorées pour développer de nouvelles approches préventives permettant de résoudre le problème d'une maladie dont le diagnostic fiable est encore un problème et pour laquelle aucun traitement réellement efficace et satisfaisant n'existe à ce jour.

Une littérature de plus en plus fournie montre clairement que l'obésité associée à des perturbations du métabolisme et de la signalisation lipidiques peuvent contribuer au déclin cognitif (Araki *et al.*, 2012 ; Fotuhi *et al.*, 2012 ; Frisardi & Imbimbo, 2012) et à la pathogenèse de la MA (Florent-Bécharde *et al.*, 2009 ; de la Monte, 2012). Les lipides occupent donc une place déterminante dans le maintien des capacités cognitives à travers leurs rôles de composants structuraux essentiels au fonctionnement synaptique, de modulateurs de l'expression des gènes et de seconds messagers contrôlant la survie cellulaire (Florent-Bécharde *et al.*, 2007). De nombreuses études ont ainsi démontré que l'homéostasie et le métabolisme des lipides sont perturbés lors du vieillissement (Cunnane *et al.*, 2012 ; Gao *et al.*, 2012).

Dans ce contexte, le DHA est assurément l'un des AGPI-*lc* les plus importants (Oster & Pillot, 2010). Sa prédominance dans les phospholipides des membranes excitables des neurones (Lauritzen *et al.*, 2001) en fait un constituant essentiel pour le maintien des fonctions neuronales dont la plasticité synaptique et la neurotransmission. Le DHA et les autres AGPI de type *n-3* alimentaires font l'objet de très nombreuses études qui ont mis en évidence divers effets pléiotropiques bénéfiques sur la santé, liés principalement à des capacités anti-inflammatoires précieuses contre les maladies métaboliques et/ou liées au vieillissement (Golub *et al.*, 2011 ; Kalupahana *et al.*, 2011 ; Kariv-Inbal *et al.*, 2012).

Les propriétés neuroprotectrices du DHA *in vitro* ont été mises en évidence et élucidées dans notre laboratoire sur le modèle de neurones exposés aux oligomères A β solubles (Florent *et al.*, 2006), ainsi que sur le modèle *in vivo* de déficit cognitif après injection intracérébrale unique d'oligomères, dans lequel les teneurs hippocampiques et corticales en DHA sont corrélées aux performances cognitives des souris, ainsi qu'au maintien des protéines synaptiques indispensables (*cf.* Résultats partie A). Ceci explique sans doute la diminution du risque de déclin cognitif et de MA parmi les populations de seniors consommant régulièrement des poissons gras ou supplémentées en AGPI-LC de type *n*-3 comme le DHA ou l'EPA rapportée par de nombreuses publications (Morris *et al.*, 2005 ; Barberger-Gateau *et al.*, 2007 ; Beydoun *et al.*, 2007 ; van Gelder *et al.*, 2007). Mais les essais cliniques utilisant le DHA pour évaluer son intérêt thérapeutique sur les démences tendent surtout à indiquer que l'AGPI-lc pourrait davantage jouer un rôle préventif qu'un rôle curatif (Cunnane *et al.*, 2009). Les études interventionnelles évaluant les effets bénéfiques éventuels d'une supplémentation en DHA sur la cognition des individus âgés sans démence diagnostiquée donnent également des résultats mitigés, certaines rapportant des performances cognitives légèrement améliorées (Fontani *et al.*, 2005 ; Freund-Levi *et al.*, 2006 ; Kotani *et al.*, 2006 ; Chiu *et al.*, 2008 ; Johnson *et al.*, 2008 ; Yurko-Mauro *et al.*, 2010), alors que d'autres n'ont montré aucun progrès (van de Rest *et al.*, 2008b ; Stough *et al.*, 2012).

Les résultats exposés dans la partie A de cette thèse ont montré qu'avec un apport énergétique constant, les souris supplémentées en DHA avaient tendance à prendre moins de poids que les souris témoins, avec une diminution significative de la cholestérolémie. Ceci suggère un intérêt plus large du DHA, car en corrigeant les dyslipidémies, facteur de risque des principales pathologies associées au vieillissement, cet AGPI-lc *n*-3 pourrait s'avérer un nutriment central pour le développement de régimes nutritionnels adaptés aux seniors. Les mêmes conclusions ont été déduites du suivi longitudinal des paramètres lipidiques sanguins et cérébraux et des capacités mnésiques chez les souris vieillissantes. De même chez l'homme, les facteurs de risque cardiovasculaire ont été montrés capables d'influer sur l'apparition de la MA et sur la structure du cerveau des individus atteints de déficit cognitif ou de démence (Ho *et al.*, 2010 ; Leduc *et al.*, 2010). Toutes ces observations font écho à plusieurs études cliniques très récentes qui ont identifié l'obésité en milieu de vie et chez les seniors comme un facteur de risque pour le déclin cognitif et la MA (Anstey *et al.*, 2011 ; Benedict *et al.*, 2011 ; Xu *et al.*, 2011 ; Lasikiewicz *et al.*, 2012 ; Luchsinger *et al.*, 2012).

Bien que les essais cliniques traitant des patients atteints de la maladie d'Alzheimer par supplémentation en AGPI-lc *n*-3 (dont le DHA) se soient soldés par des résultats négatifs, les conclusions ont également suggéré que cette supplémentation procure des effets bénéfiques dépendants de divers paramètres comme le stade de la maladie, la nature du régime lipidique ou le statut en apolipoprotéine E (Jicha & Markesbery, 2010 ; Barberger-Gateau *et al.*, 2011). Toutes ces données conduisent donc à l'hypothèse que le DHA ou des aliments gras d'origine marine pourraient être à la base d'approches nutritionnelles prometteuses dans des stratégies visant à prévenir ou retarder la survenue de syndromes liés au vieillissement dont la MA (Florent-Bécharde *et al.*, 2007).

Par ailleurs, les résultats obtenus au laboratoire sur notre modèle *in vitro* de neurones en culture exposés aux oligomères A β O nous ont incités à vouloir évaluer *in vivo* l'intérêt de régimes associant le DHA à des polyphénols doués d'activités anti-inflammatoires et antioxydantes (Shirai & Suzuki, 2004 & 2008 ; Cole *et al.*, 2005 ; Florent *et al.*, 2006 ; Higuchi *et al.*, 2006 ; Kidd, 2008 ; Rayalam *et al.*, 2008 ; Rossi *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2008). Notre équipe et d'autres ont donc postulé qu'associer DHA et polyphénols doit conduire à des effets neuroprotecteurs synergiques contre le vieillissement, en particulier cérébral, et la MA (Florent-Béchar *et al.*, 2007 ; Morris, 2009 ; Massaro *et al.*, 2010 ; Saw *et al.*, 2010). Cette étude, menée en partenariat avec la société Lesieur, propose de le vérifier par une supplémentation en huile de poisson et en huile d'olive.

2. Modèle d'étude et régimes administrés

L'étude a été basée sur le modèle de souris mâles C57Bl/6J sauvages, présentant une altération des capacités mnésiques associée à des dysfonctionnements synaptiques après une injection ICV unique d'A β O pour évaluer l'impact de divers régimes sur la cognition et la sensibilité au stress amyloïde. Un programme nutritionnel a été défini, prévoyant de contrôler durant 26 semaines (6,5 mois) l'alimentation de 300 souris dans les conditions suivantes.

- 24 souris par groupe-régime
- 2 groupes d'âge intermédiaire : entre 6 et 12 mois ou entre 9 et 15 mois
- Régimes administrés durant 24 semaines avant l'injection intracérébrale, puis lors des analyses comportementales durant 2 semaines encore sans changement de régime
- 7 traitements nutritionnels distincts (Figure 81), servis *ad libitum* sous la forme de croquettes :
 - ✓ Régime A : régime normocalorique contrôle, continu sur 26 semaines, incluant parmi les ingrédients un mélange d'huiles de colza, tournesol et pépins de raisin (26% LA, 5% ALA)
 - ✓ Régime B : régime normocalorique DHA+, continu sur 26 semaines, correspondant au régime A supplémenté en huile de poisson riche en AGPI-*lc n-3* (41% DHA, 6% EPA sous forme de TG)
 - ✓ Régime C : régime hypercalorique DIO, continu sur 26 semaines, devant conduire à une souris modérément dyslipidémique et obèse grâce à un apport excessif de lipides et de cholestérol
 - ✓ Régime D : régime hypercalorique DHA+, continu sur 26 semaines, correspondant au régime C supplémenté en huile de poisson
 - ✓ Régime E : régime hypercalorique DHA/PP+, continu sur 26 semaines, correspondant au régime D supplémenté en huile d'olive vierge extra riche en polyphénols
 - ✓ Régime F : régime hypercalorique (régime C) durant 12 semaines, puis régime normocalorique contrôle (régime A) durant 14 semaines
 - ✓ Régime G : régime hypercalorique (régime C) durant 12 semaines, puis régime normocalorique DHA+ (régime B) durant 14 semaines

La composition des régimes a été établie sur la base de la littérature et de l'expérience d'études précédentes (Tableau 9). Les ingrédients nutritionnels ont été incorporés dans la matrice alimentaire directement lors de sa fabrication par la société Safe (Augy, F-89290).

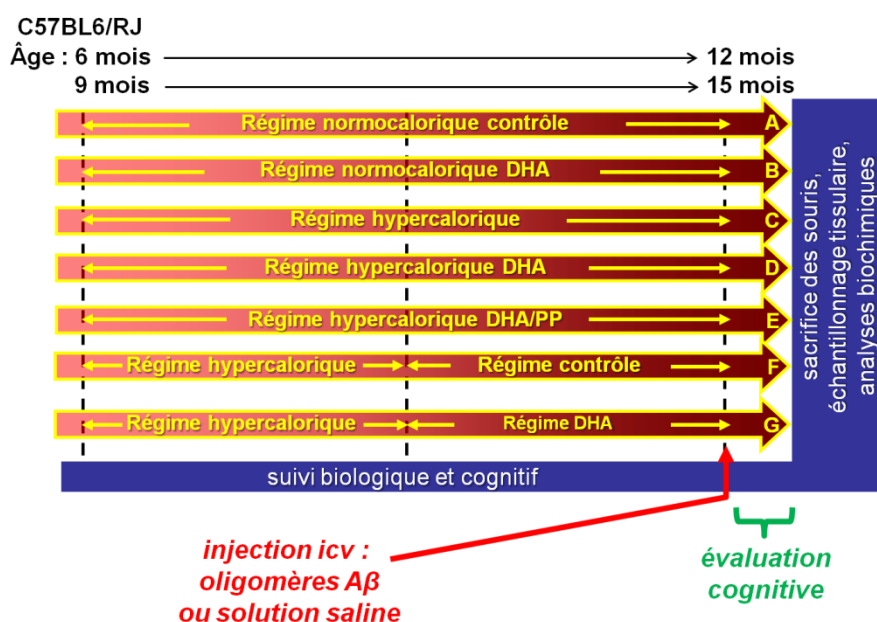


Figure 81 : Programme nutritionnel de l'étude et suivi des souris

RÉGIME	A	B	C	D	E
Caséine	20	20	26	26	26
Amidon	48	47,44	26,55	25,99	25,99
Saccharose	13,5	13,5	10	10	10
Saindoux	1	1	17	17	17
Huile	4	4,56	4,5	5,06	5,06
Cellulose	5	5	6	6	6
Minéraux	7	7	8	8	8
Vitamines	1	1	1,2	1,2	1,2
L-Cystine	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6
Cholestérol			0,15	0,15	0,15
Total	100	100	100	100	100
Densité énergétique (kcal / 100 g)	366	369	445	448	448

La densité énergétique des régimes a été calculée à l'aide des coefficients d'Atwater.

Tableau 9 : Composition des régimes administrés

Le traitement DIO (*diet-induced obesity*), prévu pour générer une dyslipidémie et une obésité modérées, a été conçu pour apporter un excès de lipides (~22%, m/m) sous forme de saindoux et de 0,15% (m/m) de cholestérol dans les régimes C, D et E. Ces derniers, comparés aux régimes A et B normocaloriques (~370 kcal/100 g, densité énergétique calculée à l'aide des coefficients d'Atwater), étaient de ce fait tous hypercaloriques (~450 kcal/100 g, soit ~22% en plus).

La supplémentation en AGPI-*n-3* a été réalisée en incorporant à la matrice des régimes B, D et E une proportion d'huile de poisson suffisante pour donner une concentration finale de 0,2% (m/m) de DHA dans l'aliment proposé aux souris. L'huile de poisson utilisée a été extraite à l'aide de procédés enzymatiques et concentrée pour contenir 41% de DHA et 6% d'EPA sous forme de TG.

Cette même huile de poisson a été utilisée dans plusieurs études sur l'effet d'une supplémentation nutritionnelle en AGPI-*lc n-3* des mères durant la grossesse ou la lactation sur le statut en DHA et la maturation du système nerveux ou visuel chez le nouveau-né humain, ainsi que sur la résistance des neurones cholinergiques corticaux contre l'excitotoxicité du NMDA chez le jeune rat (Högyes *et al.*, 2003 ; Montgomery *et al.*, 2003 ; Malcolm *et al.*, 2003 ; van Goor *et al.*, 2010 & 2011). Au-delà des effets observés, les résultats de ces travaux confirment que les AGPI-*lc n-3* apportés sous forme de TG par l'huile de poisson représentent une forme parfaitement biodisponible propice à notre étude.

Cette étude prévoyait aussi d'évaluer l'intérêt synergique possible d'une supplémentation nutritionnelle associant les AGPI-*lc n-3* à des polyphénols dont le potentiel antioxydant, anti-inflammatoire et anti-âge commence à être bien documenté. Les principaux composés issus de cette famille et testés dans le cadre d'une protection cérébrale contre le stress amyloïde et le vieillissement en général sont plutôt de nature hydrosoluble, comme les catéchines extraites des feuilles de thé vert ou le resvératrol de la peau du grain de raisin. Ils sont de plus issus de sources végétales pas ou peu exploitées par l'industrie des huiles alimentaires et il nous a paru préférable d'opter plutôt pour des composés liposolubles présents dans les plantes oléagineuses. Le choix s'est porté sur l'huile d'olive vierge extra qui contient au moins 280 ppm de polyphénols. C'est ainsi qu'a été fabriqué le régime E, enrichi notamment de 10 à 12 mg de polyphénols/kg d'aliment, les régimes C et D en étant dépourvus puisque renfermant eux de l'huile d'olive raffinée.

Par souci d'homogénéité, les lipides ont été apportés sous deux formes : (1) le saindoux, un ingrédient couramment utilisé pour la fabrication des aliments des rongeurs, dont les teneurs ont été augmentées dans les régimes hyperlipidiques C, D et E, obligeant à ajuster en conséquence les teneurs en caséine et en amidon à des niveaux acceptables ne risquant pas d'induire de carence ou de dysfonction métabolique ; (2) l'huile, l'ingrédient spécifique de chaque régime, mélange dont la composition a été définie pour apporter les teneurs désirées en AGPI-*lc n-3* et polyphénols, tous les régimes présentant des taux de tocophérols équivalents (entre 120 et 165 mg/kg d'aliment). Ainsi, 5 huiles spécifiques ont été préparées par la société Lesieur, puis adressées à la société Safe pour incorporation directe dans la matrice alimentaire. Ces huiles présentaient la composition suivante :

- ✓ Huile A : huiles végétales (100%)
- ✓ Huile B : huiles végétales (87,7%) + huile de poisson (12,3%)
- ✓ Huile C : huile d'olive raffinée (100%)
- ✓ Huile D : huile d'olive raffinée (88,9%) + huile de poisson (11,1%)
- ✓ Huile E : huile d'olive vierge extra (88,9%) + huile de poisson (11,1%)

Les régimes composés pour cette étude ont été soumis à des analyses pour vérifier la composition en acides gras dans les aliments. La présence des AGPI-LC *n-3* comme le DHA et l'EPA a été confirmée dans les proportions attendues dans les 3 régimes B, D et E grâce au protocole développé par le laboratoire de la société Lesieur pour extraire les acides gras à partir des aliments (Tableau 10).

	Régimes					Huiles				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
AG saturés	20,89	16,15	35,89	33,95	33,45	8,00	9,13	13,50	14,12	14,10
C16:0	12,33	9,62	22,70	21,76	21,46	4,44	5,15	9,98	10,18	10,14
AG insaturés	79,11	83,85	64,11	65,11	65,30	91,88	90,20	86,23	85,35	85,04
C18:1 et isomères	67,11	57,75	52,84	50,61	50,43	60,35	54,92	77,44	71,22	71,07
AG mono-insaturés	69,17	60,02	56,29	54,07	53,97	61,47	56,58	78,52	72,80	72,60
AG polyinsaturés	9,93	23,83	7,82	11,04	11,33	30,41	33,62	7,71	12,55	12,44
CLA (conjugated LA)	1,04	0,39	0,22	0,14	0,18	nr	nr	nr	nr	nr
AG trans	0	0,23	0,17	0,08	0,08	0,33	0,36	0,04	0,07	0,06
AG n-3	0,69	5,39	0,50	1,46	1,64	4,70	9,98	0,73	5,63	5,68
C18:3 (ALA)	0,69	2,76	0,44	0,70	0,71	4,70	4,24	0,73	0,67	0,61
C20:5 (EPA)	Nd	0,37	Nd	0,10	0,13	nd	0,75	nd	0,64	0,66
C22:5 (DPA)	Nd	0,12	Nd	0,08	0,09	nd	0,22	nd	0,19	0,20
C22:6 (DHA)	Nd	2,05	Nd	0,56	0,69	nd	4,52	nd	3,89	3,97
AG n-6	8,22	18,03	7,01	9,10	9,20	25,33	23,15	6,94	6,77	6,62
C18:2	8,22	17,76	6,95	8,89	8,98	25,33	22,64	6,94	6,34	6,18
AG n-6/n-3	11,90	3,29	14,09	6,23	5,61	5,39	2,32	9,51	1,20	1,17
C18:1/C16:0	5,44	6,01	2,33	2,33	2,35	13,59	10,66	7,76	7,00	7,01
AGS/AG n-3	30,26	3,00	72,18	23,30	20,40	1,70	0,92	18,49	2,51	2,48
Matière grasse (%)	4,8	5,1	20,2	22	21,7					

nd : non détecté ; nr : non recherché
Résultats indiqués en % relatif

Tableau 10 : Teneurs en acides gras dans les régimes et les huiles

Les résultats sont indiqués en % relatif.

Les teneurs relatives de DHA et EPA mesurées à partir des lipides extraits de ces trois régimes ont été considérées comme équivalentes en raison de la proportion plus élevée de matière grasse liée à l'excès d'acides gras saturés dans les régimes D et E (comme C). Les analyses menées en parallèle sur chacune des huiles ingrédients ont confirmé des teneurs comparables en DHA et EPA. Mais elles ont aussi montré une proportion d'acide ALA bien supérieure dans les régimes A et B, en raison de leur base composée notamment d'huile de colza naturellement riche en ALA. L'influence éventuelle de ce précurseur AGPI *n*-3 devra être prise en considération dans l'analyse des résultats du suivi de l'enrichissement en DHA au terme du programme nutritionnel de l'étude.

NB : Pour plus de clarté et sauf indication contraire, nous avons choisi de ne montrer ci-après que les résultats sur les souris les plus âgées.

3. Paramètres biologiques (prise alimentaire, poids corporel, masse grasse)

Le suivi alimentaire a consisté évaluer la quantité d'aliment consommée deux fois par semaine. Les souris semblent être passées facilement du régime standard Harlan 2018S d'avant l'étude aux régimes proposés, la prise alimentaire n'ayant montré aucune rupture réelle entre les deux périodes. Certaines croquettes des régimes A et B se sont avérées trop dures pour les souris qui, d'une fois à l'autre, ont consommé 50% d'aliment en moins en raison des efforts importants à fournir pour pouvoir se nourrir à partir de la mangeoire en surplomb. Pour ne pas risquer de perturber l'évolution de la masse corporelle des souris, nous avons dû concasser l'aliment et le placer dans une coupelle posée directement dans la litière. Ces manipulations supplémentaires ont été plutôt fastidieuses et nous avons dû espacer davantage la fréquence de mesure de la prise des aliments A et B. Le moment à partir duquel nous avons procédé ainsi a été indiqué par une flèche noire sur la Figure 82.

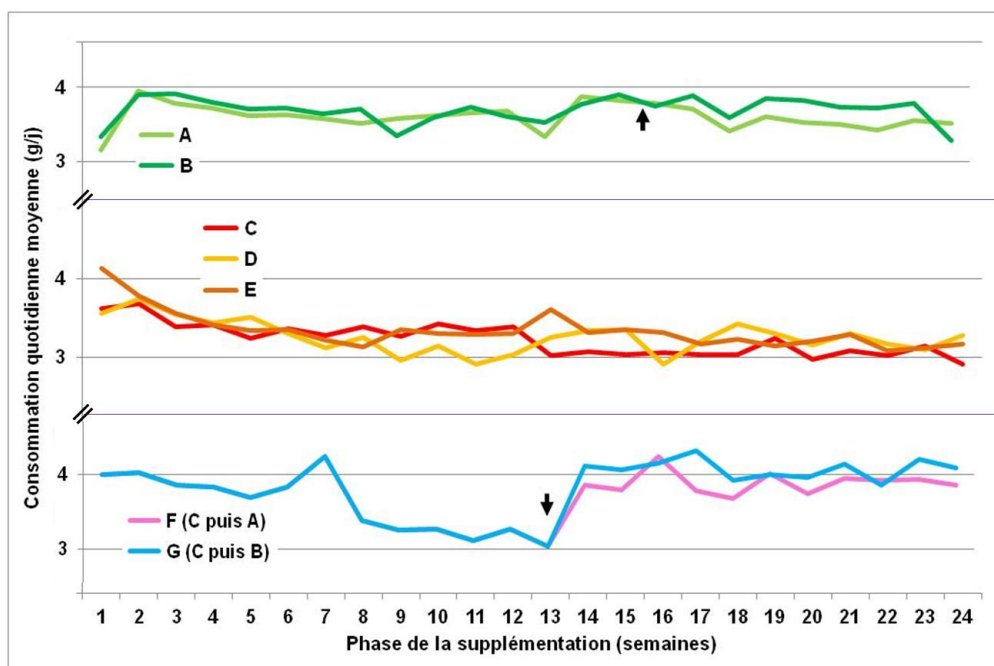


Figure 82 : Suivi alimentaire durant le programme nutritionnel

Les résultats représentent la quantité moyenne d'aliment consommé chaque jour par les souris du groupe.

Il apparaît clairement que les souris sous régime normocalorique sans distinction ont stabilisé leur consommation alimentaire en 3 à 4 semaines autour de 3,7 g/j et que ces souris ont pu maintenir une consommation très comparable, quelle que soit la façon avec laquelle les croquettes leur étaient présentées. En revanche, les souris sous régime hypercalorique ont progressivement diminué leurs apports pour finir autour de 3,1 g/j. Enfin, la comparaison des régimes F et G confirme que les souris sous régime C adaptent leur consommation à la baisse, avant d'augmenter leur prise alimentaire sitôt qu'elles sont passées sous régime normocalorique A ou B.

Ce suivi alimentaire nous a permis de considérer que les souris avaient une consommation stable sur la période allant de 4 à 24 semaines. C'est ainsi que nous avons estimé la consommation moyenne à environ 3,6 g/j par souris sous régime normocalorique A ou B, et à environ 3,2 g/j sous régime hypercalorique C, D ou E (Figure 83). Cette différence de près de 12%, très significative ($p < 0,001$), était attendue, les souris ajustant spontanément leur apport nutritif selon l'apport calorique, ce qui est une caractéristique connue de leur comportement alimentaire. Les barres d'erreur représentées sur l'histogramme attestent de la grande stabilité de la consommation quotidienne, quel que soit le régime, conformément au suivi de la prise alimentaire en fonction du temps illustré par la Figure 82.

a. Apport calorique

Malgré l'ajustement de la quantité d'aliment consommé évoqué ci-dessus, les souris sous régime hyperlipidique ingéraient en moyenne 14,5 kcal/j, soit un apport calorique de ~7,5% supérieur à celui des souris sous régime normolipidique (13,5 kcal/j), une différence faible mais significative ($p < 0,001$) qui a son importance dans les résultats spécifiques suivants (Figure 84).

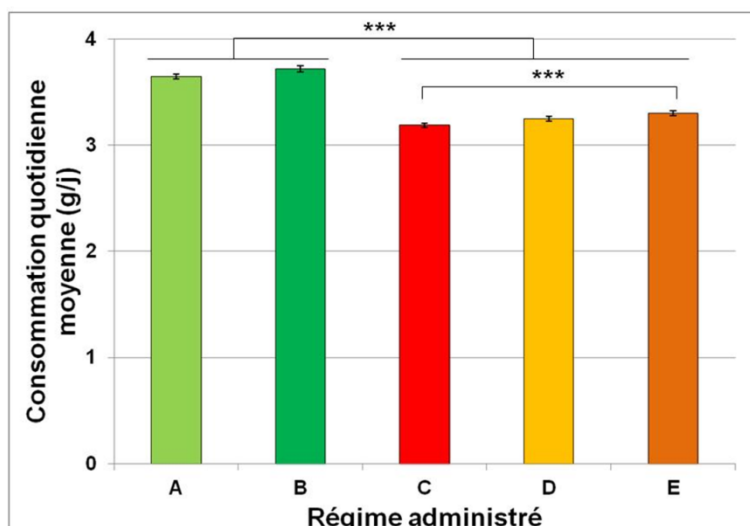


Figure 83 : Consommation quotidienne moyenne selon les régimes
Les résultats sont représentés par la moyenne \pm erreur standard.

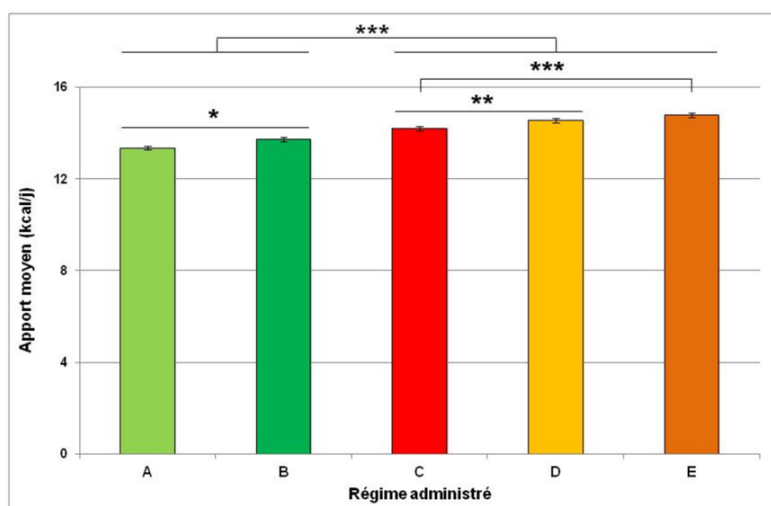


Figure 84 : Apport énergétique quotidien moyen selon les régimes
Les résultats sont représentés par la moyenne \pm erreur standard.

Nous avons constaté que les souris sous régime B ou D ont bénéficié d'un apport calorique supérieur à celui des souris sous régime A ou C, en raison à la fois d'une consommation et d'une densité énergétique de l'aliment un peu plus élevées. La prise alimentaire et l'apport énergétique sont apparus encore supérieurs pour les souris sous régime E par rapport aux autres régimes hyperlipidiques. Il est difficile d'expliquer ces différences autrement qu'en spéculant sur les propriétés spécifiques des aliments enrichis. Comme nous l'avons proposé pour les croquettes enrichies en alcool vanillique (*cf.* Résultats Partie A), il ne peut être exclu que les constituants de l'huile de poisson comme les AGPI-*lc n-3* et/ou ceux de l'huile d'olive vierge extra comme les polyphénols aient pu rendre l'aliment plus facile ou plus agréable à consommer que les aliments A ou C qui en sont dépourvus. Cependant, cette hypothèse est sans objet pour les souris plus jeunes, âgées de 6 à 12 mois, qui n'ont pas montré de prise alimentaire différente, même si la consommation des régimes hyperlipidiques C, D et E ont conduit à un apport énergétique supérieur à celle des régimes A et B.

b. Masse corporelle

Chacune des souris de l'étude a été pesée chaque semaine, ce qui nous a permis de constater des résultats distincts selon les groupes d'animaux. Précisons que ce suivi nous a notamment permis de vérifier que ce paramètre n'a été affecté ni par la consistance des croquettes des régimes A et B, ni par le changement de mode de présentation de la nourriture, deux problèmes qui ont été évoqués précédemment.

Nous avons recherché les conditions dans lesquelles la masse corporelle des souris avait été modifiée lors du programme nutritionnel. Comme pour tous les paramètres étudiés ci-après, nous avons procédé à une analyse de variance ANOVA à deux facteurs permettant d'évaluer l'influence de la nature et de la phase (plutôt que l'âge des souris) du régime, individuellement ou en interaction, sur la masse corporelle et sur la variation de la masse corporelle. Tenant compte des interprétations ci-dessus, nous avons distingué les analyses sur trois périodes : de la semaine 2 à la semaine 22 (S2-22), puis isolément durant les 2 périodes S2-12 et S12-22 (Tableau 11). Comme le montrent les résultats ci-dessous, les facteurs nature et phase du régime sont individuellement capables d'influer sur la masse corporelle et sur la variation de masse, quelle que soit la période considérée. Mais l'analyse ANOVA indique aussi qu'hormis lors de la 1^{ère} période pour la masse corporelle, les facteurs nature et phase du régime interagissent pour influencer sur la masse corporelle et sur la variation nette de la masse.

ANOVA		Masse corporelle					
		Sem 2-12		Sem 12-22		Sem 2-22	
		F	p	F	p	F	p
Nature du régime	13,544	< 0,0001	18,511	< 0,0001	22,253	< 0,0001	
Phase du régime	6,6686	0,0002	25,756	< 0,0001	46,905	< 0,0001	
Nature x Phase	1,136	0,3126	3,429	< 0,0001	3,457	< 0,0001	

ANOVA		Variation de masse corporelle					
		Sem 2-12		Sem 12-22		Sem 2-22	
		F	p	F	p	F	p
Nature du régime	2,73	0,0131	24,357	< 0,0001	7,876	< 0,0001	
Phase du régime	10,503	< 0,0001	13,714	< 0,0001	13,796	< 0,0001	
Nature x Phase	5,386	< 0,0001	5,373	< 0,0001	7,784	< 0,0001	

Tableau 11 : Évolution de la masse corporelle des souris (ANOVA à 2 facteurs)

Nous avons tracé les profils d'évolution de la masse corporelle durant le programme nutritionnel. Ils montrent qu'à partir de la 22^e semaine, les souris de tous les groupes ont subi une perte de masse corporelle telle qu'elles ont terminé l'étude (26^e semaine) sensiblement au niveau de la 18^e semaine (Figure 85). Aucun indice n'a été observé lors des expérimentations qui puisse expliquer cette baisse, d'autant qu'il faut bien préciser que la consommation alimentaire quotidienne n'a montré aucune diminution particulière. Néanmoins, à partir de la 23^e semaine et juste avant la phase chirurgicale, nous avons dû procéder aux dernières analyses de suivi, ce qui a nécessité des manipulations plus rapprochées susceptibles d'avoir généré un stress particulier qui a pu activer alors de nouveaux mécanismes (dé-) régulateurs. Il aurait été intéressant de vérifier si la baisse de masse corporelle amorcée à la 22^e semaine se poursuivait au-delà

de la 26^e semaine à laquelle l'étude *in vivo* s'est achevée. Quoiqu'il en soit, nous n'avons analysé pour la suite que les résultats de masse corporelle mesurés entre la 2^e et la 22^e semaine.

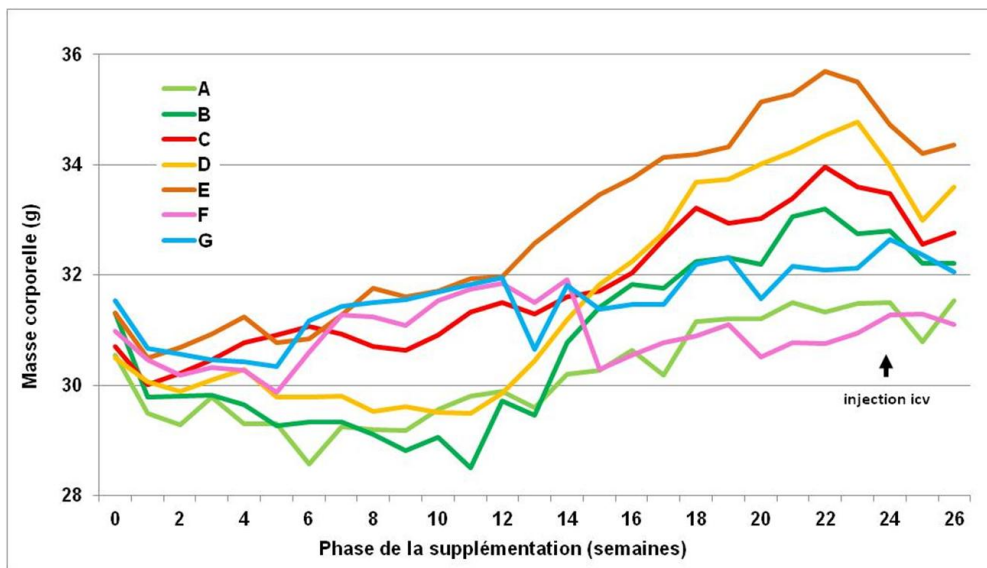


Figure 85 : Évolution de la masse corporelle durant le programme nutritionnel
Résultats indiqués : moyennes des souris du groupe

Nous avons choisi de modifier ces informations afin de tracer la variation nette dans le temps de la différence de masse corporelle des souris par rapport à la valeur initiale à T0 (Figure 86).

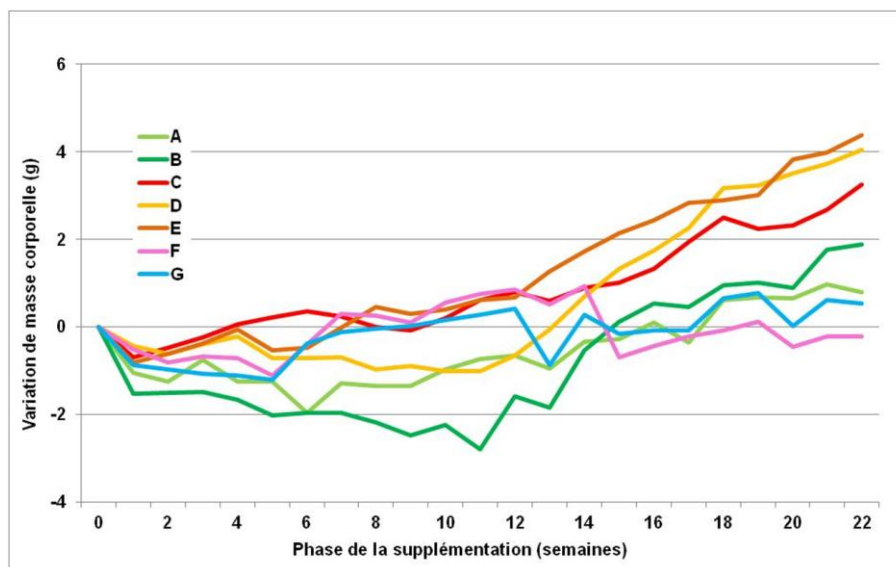


Figure 86 : Évolution de la variation de la masse corporelle selon les régimes

Les profils ne sont pas significativement différents, puisque toutes les souris ont démarré l'étude avec une masse corporelle initiale très semblable, aux alentours de 31 g. Mais ils permettent de constater que par rapport à T0, les souris sous régime B ont perdu jusqu'à 2,8 g (soit -9% de leur masse initiale) vers la 11^e semaine, et cela d'une façon que nous pouvons qualifier de physiologique, puisque sans pathologie apparente ni privation. À l'inverse, les souris sous régime E ont gagné jusqu'à 4,4 g (soit

+14% de leur masse initiale) après 22 semaines sous alimentation hyperlipidique. À l'issue du programme nutritionnel, nous avons distingué une catégorie de souris dont le gain de poids est supérieur à 2 g et qui ont toutes reçu un régime hypercalorique et enrichi en lipides de type AGS et cholestérol. Elles présentent en conséquence un surpoids significatif par rapport à l'autre catégorie de souris correspondant aux groupes sous régime normocalorique, y compris celles des groupes F et G placées 12 semaines sous régime C avant de passer sous régime A ou B.

Les différences de masse corporelle lors de chaque période du programme nutritionnel (S2-12, S12-22 ou S2-22) ont été calculées pour chaque souris avant de définir la moyenne du groupe et de mener les analyses statistiques (Figure 87). Notons que les valeurs utilisées pour illustrer les variations de tous les paramètres ci-après ont été calculées de façon similaire. Les graphiques obtenus suggèrent un effet anti-obésité des AGPI-lc *n-3* observés durant la première période S2-12 du programme nutritionnel chez les souris sous régime B et D comparativement aux souris des groupes témoins homologues respectifs A et C. Mais cet effet bénéfique s'est dissipé durant la période S12-22 au terme de laquelle les souris supplémentées en AGPI-lc *n-3* sont celles qui ont gagné le plus de poids.

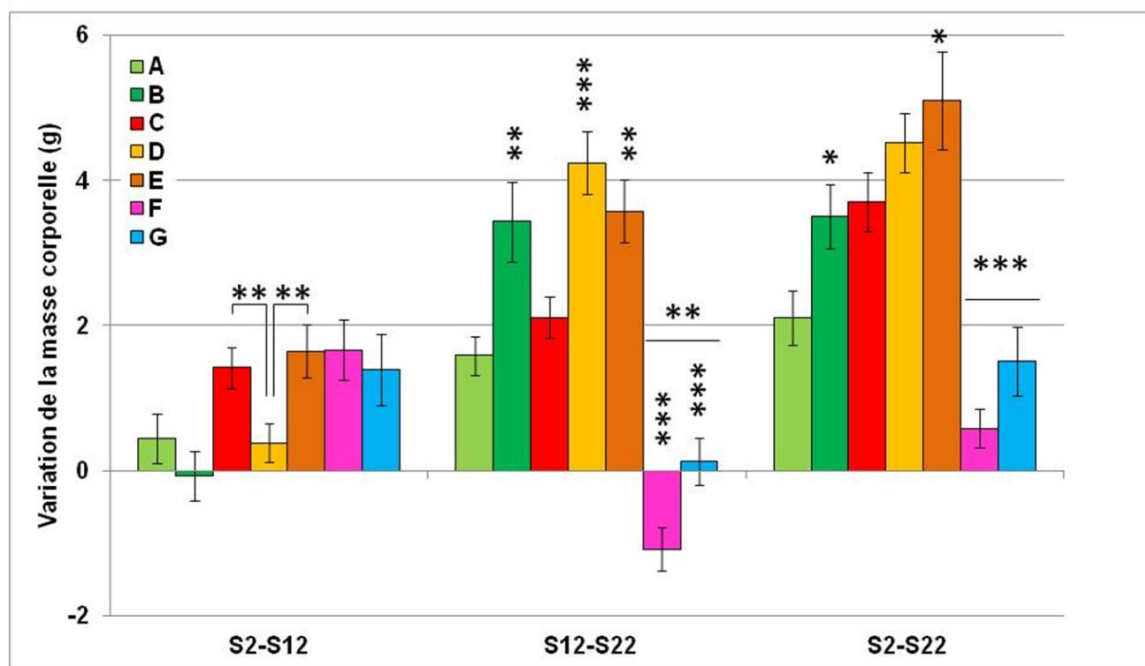


Figure 87 : Variations de la masse corporelle selon le régime et la période

Les résultats sont représentés par la moyenne \pm erreur standard des variations de chaque souris du groupe. Les différences statistiques sont établies en comparant la moyenne à celle du groupe témoin homologue A ou C.

Une analyse plus fine a été menée en comparant de manière plus détaillée les profils de variation de la masse corporelle des souris des différents groupes (Figure 88). Les souris sous régime A et B ont évolué de façon semblable, avec une baisse de masse de plus de 2 g durant les deux premiers mois pour atteindre une moyenne apparemment stabilisée autour de 29 g, avant d'inverser la tendance à partir de la 12^e semaine pour finir l'étude avec une masse corporelle d'environ 32 g, soit un gain net proche de 1 g. L'apport des AGPI-lc *n-3* présents dans le régime B semble associé à une baisse plus marquée dans le

premier trimestre du programme nutritionnel, mais aussi à une reprise plus rapide (+4 g entre la 11^e et la 22^e semaine sous régime B vs. +2 g sous régime A). Un changement, bien plus visible chez les souris sous régime B qui accusent des variations d'une amplitude supérieure, semble donc s'opérer à partir de la 12^e semaine autour de laquelle se situe apparemment un moment déterminant pour les effets des régimes sur la masse corporelle, ainsi que sur d'autres critères comme nous le verrons plus loin. Curieusement, les profils des groupes de souris âgées de 6 mois ou âgées de 9 mois au début de l'étude nous ont conduits à observer cette même rupture, quoique moins marquée pour les souris plus jeunes, autour de cette même période charnière de la 12^e semaine. Ceci écarte *a priori* l'hypothèse d'une réponse liée à une certaine forme de vieillissement. Évidemment, les souris n'ont subi aucun changement notable des conditions d'élevage et de traitement à ce stade. Il est donc probable qu'après les trois premiers mois du programme nutritionnel, les différents régimes aient pu modifier certains paramètres physiologiques ou métaboliques des souris, en particulier ceux concernant l'homéostasie lipidique, et induire en conséquence des processus de réponse régulés qui restent à identifier et qui pourraient être impliqués dans les modifications constatées.

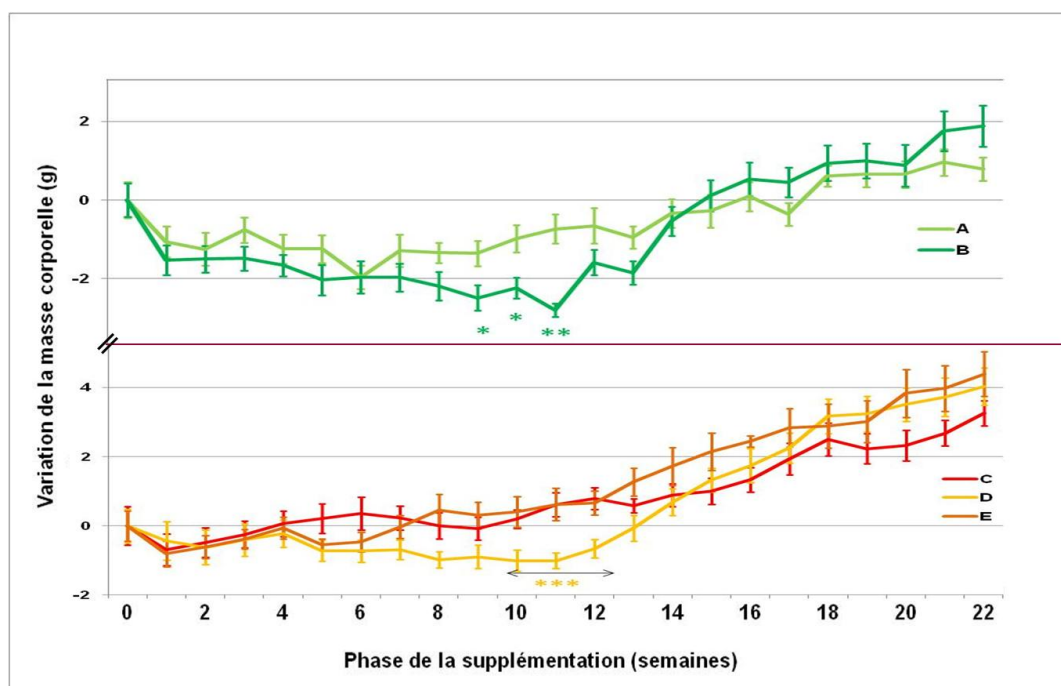


Figure 88 : Évolution détaillée de la variation de la masse corporelle selon les régimes
Les différences statistiques sont établies en comparant la moyenne à celle du groupe témoin homologue A ou C.

Les souris sous régime hypercalorique quant à elles ont toujours montré une masse corporelle supérieure à celle des souris sous régime normocalorique (Figure 88). À l'inverse de ces dernières, elles n'ont pas connu de perte initiale et ont évolué de façon assez régulière vers le surpoids, avec des différences notables toutefois. Ainsi, les souris sous régime hypercalorique enrichi en AGPI-*lc n-3* (D et E) montrent une prise de poids significativement supérieure à celles sous régime normocalorique (Figure 88). Ce phénomène, déjà constaté quoique moins marqué en comparant les souris sous régime B

à celles sous régime A, pourrait laisser penser que les AGPI-lc *n-3* favorisent la prise de poids, au moins sur le long terme. Mais comme les souris du groupe B, les souris sous régime D présentent une masse corporelle significativement plus faible ($p < 0,001$) durant la première moitié de l'étude comparées à celles des régimes A ou C privées de supplémentation en AGPI-lc *n-3*, ce qui est concorde parfaitement avec ce que nous avons constaté lors de la supplémentation longue décrite dans la Partie A des Résultats et qui a précisément duré trois mois. Ces observations suggèrent donc plutôt que les AGPI-lc *n-3* puissent contribuer à retarder ou ralentir la prise de poids, en particulier lors d'apports lipidiques excessifs. Elles sont d'autant plus intéressantes que les souris sous régime C ou D ont montré une consommation alimentaire et un apport énergétique identiques, étayant l'idée que la présence d'AGPI-lc *n-3* dans un régime hypercalorique et hyperlipidique puisse prévenir l'obésité.

En revanche, bien que supplémentées elles aussi en AGPI-lc *n-3*, les souris sous régime E ont montré la prise de poids la plus importante comparativement aux autres groupes-régimes, pesant plus de 36 g après 22 semaines, soit une augmentation moyenne de plus de 4 g (environ 15% de la masse corporelle initiale). Ce résultat suggère une influence plutôt inattendue des polyphénols et autres composés de l'huile d'olive vierge extra qui différencient les régimes D et E et exercent des effets visiblement antagonistes, déjà visibles après 12 semaines, sur les bénéfices induits par la consommation des AGPI-lc *n-3*. Nous n'avons trouvé aucun article de littérature faisant mention d'un pareil effet, les composés phénoliques étant plutôt souvent associés à une amélioration de l'obésité (masse corporelle et adiposité) et du syndrome métabolique chez la souris (Chen *et al.*, 2011 ; Sae-tan *et al.*, 2011 ; Pu *et al.*, 2012). Au vu de ces résultats et des suivants, il faut probablement admettre qu'avoir opté pour un programme nutritionnel d'une durée aussi longue a eu comme conséquence de complexifier encore l'étude. Une durée limitée à 3 mois, comme dans la majorité des études comparables publiées, aurait certainement suffi pour observer les effets directs des nutriments testés.

Nous avons vérifié si les variations de masse corporelle pouvaient être corrélées à la prise alimentaire, ou plus précisément à l'apport énergétique, durant les différentes périodes du programme nutritionnel et selon la nature normo- ou hyperlipidique du régime administré. Analysés lors de chaque période séparée, les résultats suggèrent que l'apport énergétique alimentaire n'influence pas significativement la masse corporelle, quel que soit le régime (Tableau 12). Seule l'analyse intégrant les variations enregistrées sur toute la durée S2-22 du programme a permis d'identifier une corrélation faible mais significative, mais ne concernant pas les seuls régimes hyperlipidiques. Ceci tend donc à renforcer l'hypothèse selon laquelle les différences constatées ci-dessus pourraient bien être davantage liées aux spécificités qualitatives des régimes.

Enfin, comme nous nous y attendions, les souris sous régime F et G évoluent différemment sur les deux périodes : après avoir augmenté leur masse corporelle durant la période S2-22 de façon comparable aux souris sous régime C comme elles, la tendance s'est modifiée lors de la période S12-22. Mais les souris F passées sous régime A en perdant du poids, se sont distinguées significativement des

souris G qui ont plutôt stabilisé leur masse corporelle sous régime B. Cette différence aussi peut être expliquée par la supplémentation par les AGPI-*lc n-3*, la masse corporelle des souris des groupes F et G a évolué différemment à partir de la 13^e semaine (Figures 85-87 & 89). Placées sous régime C durant les 12 premières semaines du programme, ces souris ont évidemment montré une prise de poids tout à fait comparable à celle des souris du groupe C au même stade. Mais alors que les souris restées sous régime C ont continué à prendre du poids, la masse corporelle de celles des groupes F et G passées respectivement sous régime normocalorique A ou B a cessé d'augmenter, les courbes correspondantes s'étant aplaties pour évoluer de façon très comparable à celles des souris des groupes A et B. Ainsi, les souris du groupe G ont fini légèrement plus lourdes que celles du groupe F, à l'instar des souris du groupe B comparativement à celles du groupe A. La tendance de prise de poids induite sous régime C a donc semblé littéralement gommée pour laisser place à une évolution tout à fait comparable à celle des groupes témoins homologues.

Spearman	Corrélations entre apport énergétique et masse corporelle					
	Sem 2-12		Sem 12-22		Sem 2-22	
	Rhò	p	Rhò	p	Rhò	p
Tous les régimes	0,251	0,3479	0,465	0,0818	0,442	0,0173
Régimes normolipidiques	0,771	0,0845	0,371	0,4062	0,538	0,0266
Régimes hyperlipidiques	0,267	0,6374	0,688	0,0518	0,0559	0,0635

Tableau 12 : Corrélations entre l'apport énergétique et la masse corporelle des souris

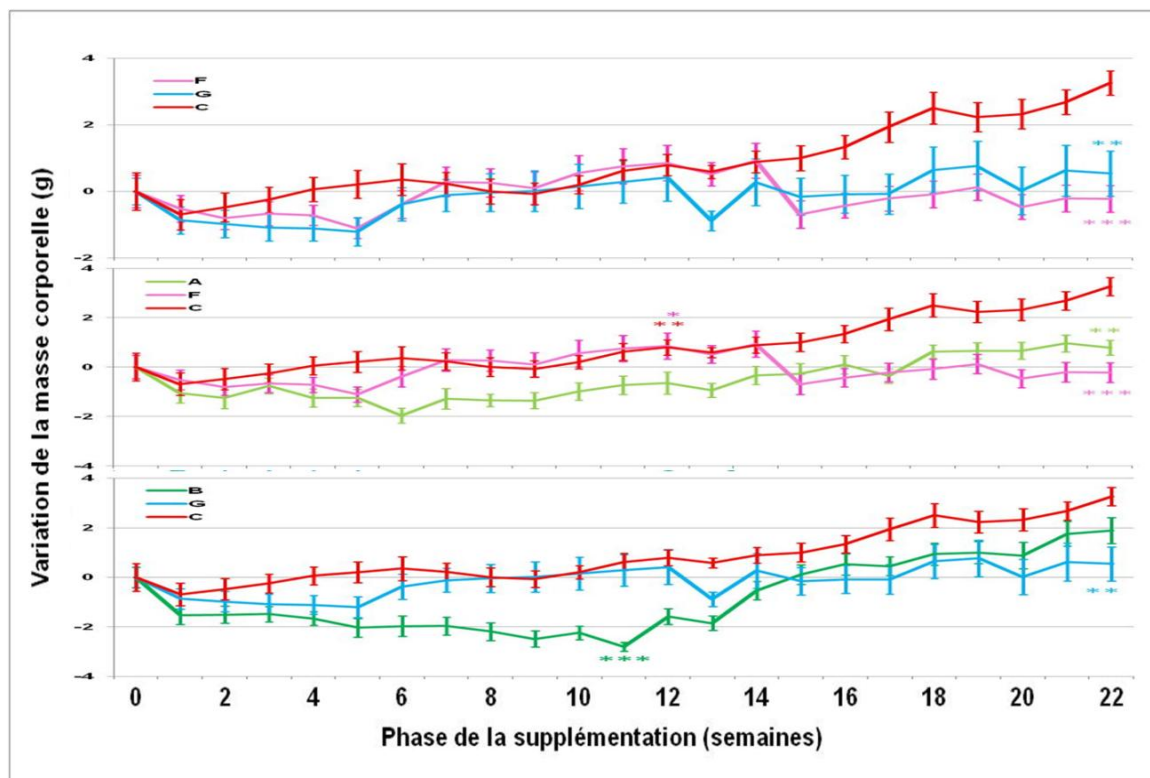


Figure 89 : Évolution détaillée de la variation de la masse corporelle des souris F et G. Les différences statistiques sont établies comparativement au régime témoin homologue C.

L'une de nos hypothèses initiales visait justement à vérifier qu'une supplémentation en AGPI-*lc n-3* peut favoriser ou accélérer la correction du phénotype induit par le régime hypercalorique C. Les résultats que nous venons juste de discuter ne confirment pas cette hypothèse, puisque les souris des groupes F et G corrigent leur masse corporelle de façon très semblable, le passage sous régime normocalorique A semblant largement suffire pour normaliser la masse des souris F, alors que le passage sous régime normocalorique B n'a plutôt fait « que » stabiliser la masse corporelle des souris G. Les AGPI-*lc n-3* semblent donc n'exercer aucun effet bénéfique favorisant la correction de la masse corporelle des souris passées d'un régime hypercalorique à un régime normocalorique.

c. Masse grasse

Parallèlement, nous avons suivi l'évolution de la masse grasse des souris, exprimée en % de la masse corporelle. Les résultats obtenus indiquent une influence très nette des régimes administrés sur la proportion de tissu adipeux davantage que sur la variation d'adiposité (Tableau 13). Cette influence ne s'exerce pas seulement par la nature du régime, mais aussi selon la phase du régime, en accord avec l'évolution diphasique de l'adiposité (Figures 90 à 92). Notons toutefois que ce type de profil est certainement accentué aussi par le fait que la masse grasse n'a été mesurée qu'aux semaines 0, 12 et 24, afin de limiter l'impact éventuel de mesures trop fréquentes nécessairement effectuées sous anesthésie.

		Masse grasse				
		F	p			
ANOVA		Sem 0-12		ANOVA		
Nature du régime		7,082	< 0,0001	Variation de masse grasse		
Phase du régime		14,871	< 0,0001	Sem 0-12-24		
Nature x Phase		4,641	< 0,0001	ANOVA		
		Sem 12-24		F		
Nature du régime		14	< 0,0001	Nature du régime		
Phase du régime		2,24	0,1358	Phase du régime		
Nature x Phase		6	< 0,0001	Nature x Phase		
		Sem 0-12-24		p		
Nature du régime		11,391	< 0,0001	Nature du régime		
Phase du régime		14,646	< 0,0001	Phase du régime		
Nature x Phase		5,653	< 0,0001	Nature x Phase		

Tableau 13 : Évolution de la masse grasse des souris (ANOVA à 2 facteurs)

Les résultats les plus attendus sont ceux sur les souris des groupes F et G qui retrouvent le niveau de masse grasse initiale après être passées du régime C à un régime normocalorique. Mais l'aspect des graphiques des souris sous régimes A et B confirme néanmoins la possibilité apparente d'un changement de phase autour de la 12^e semaine du programme nutritionnel, même si les deux groupes de souris conservent une proportion de masse grasse très voisine et globalement stable aux alentours de 19,5-20% de la masse corporelle (Figures 90 à 93). Ces deux régimes peuvent donc bien être qualifiés de normocaloriques.

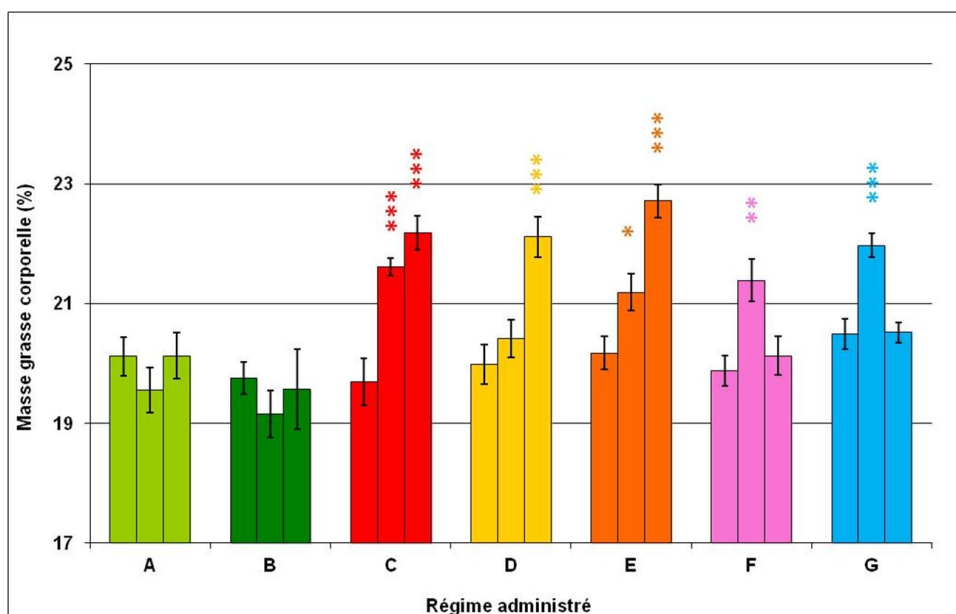


Figure 90 : Effets des régimes sur l'évolution de la masse grasse des souris

Les différences statistiques sont établies en comparant la masse grasse moyenne des souris du groupe-régime après 12 (barre du milieu de chaque massif) ou 24 semaines (barre de droite) à la masse grasse moyenne à T0 (barre de gauche).

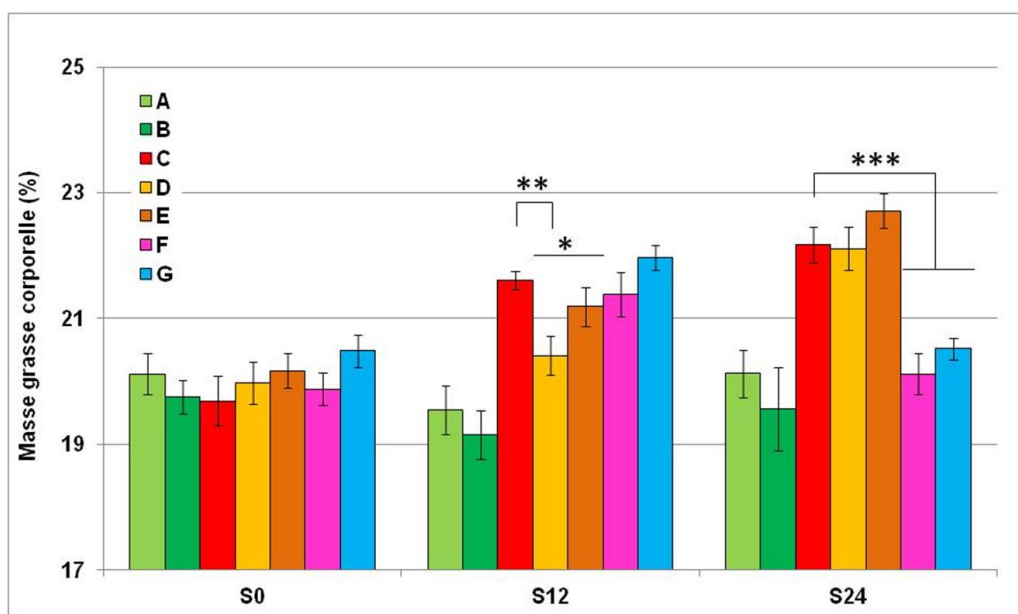


Figure 91 : Effets des régimes sur l'évolution de la masse grasse des souris

Les souris sous régime hyperlipidique ont en revanche toujours montré une augmentation de leur masse grasse entre deux mesures, conduisant progressivement les souris sous régime C vers le phénotype DIO attendu, avec une masse grasse de plus de 22%, soit une augmentation de plus de 10% depuis le début de l'étude. En comparaison, les souris sous régime D n'ont montré que peu d'augmentation de leur masse grasse durant les 12 premières semaines, alors que les souris sous régime E ont atteint une proportion intermédiaire ($p < 0,05$). Ces observations renforcent très clairement la conclusion formulée ci-dessus sur un possible « effet retard » bénéfique des AGPI- ω -3 sur l'accroissement de la masse grasse comme sur l'état de surpoids.

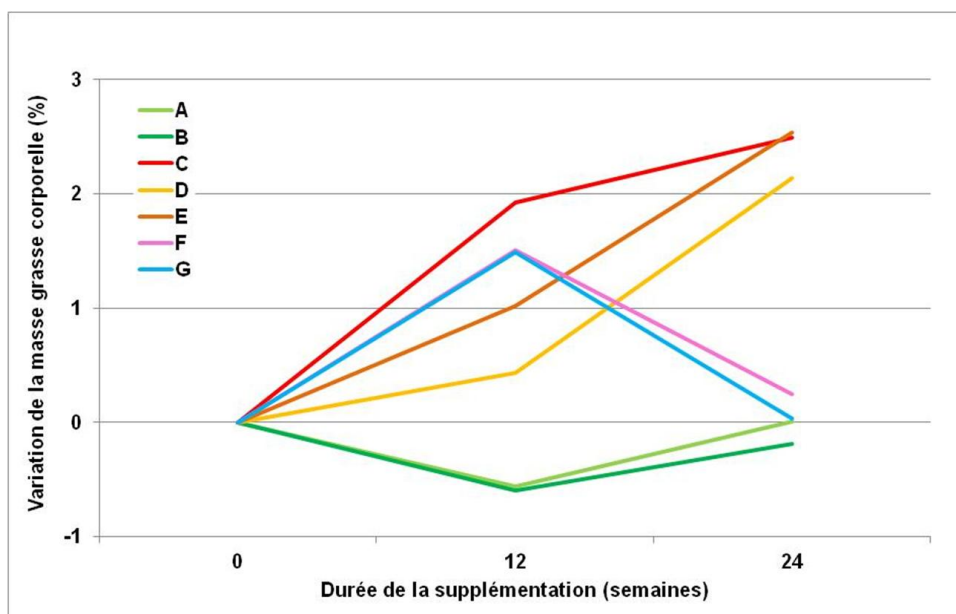


Figure 92 : Évolution de la masse grasse durant le programme nutritionnel

Nos résultats suggèrent aussi que cet effet soit partiellement annihilé par les ingrédients spécifiques de l'huile d'olive vierge extra présents dans le seul régime E qui a conduit aux souris présentant les valeurs de masse corporelle et de masse grasse les plus élevées de l'étude, surtout parmi les souris de la classe d'âge de 9 à 15 mois. Il faut donc admettre que les polyphénols et autres composés présents dans l'huile d'olive vierge extra, même ajoutés en faibles teneurs dans le régime E, puissent bien exercer, à ce stade, des effets biologiques antagonistes de ceux des AGPI-*lc n-3*. Ces conclusions doivent néanmoins être confirmées, puisqu'elles sont en contradiction avec les effets anti-adiposité et anti-obésité exercés par des polyphénols de diverses autres sources et rapportés récemment (Jeon *et al.*, 2012 ; Min *et al.*, 2012 ; Ueda & Ashida, 2012).

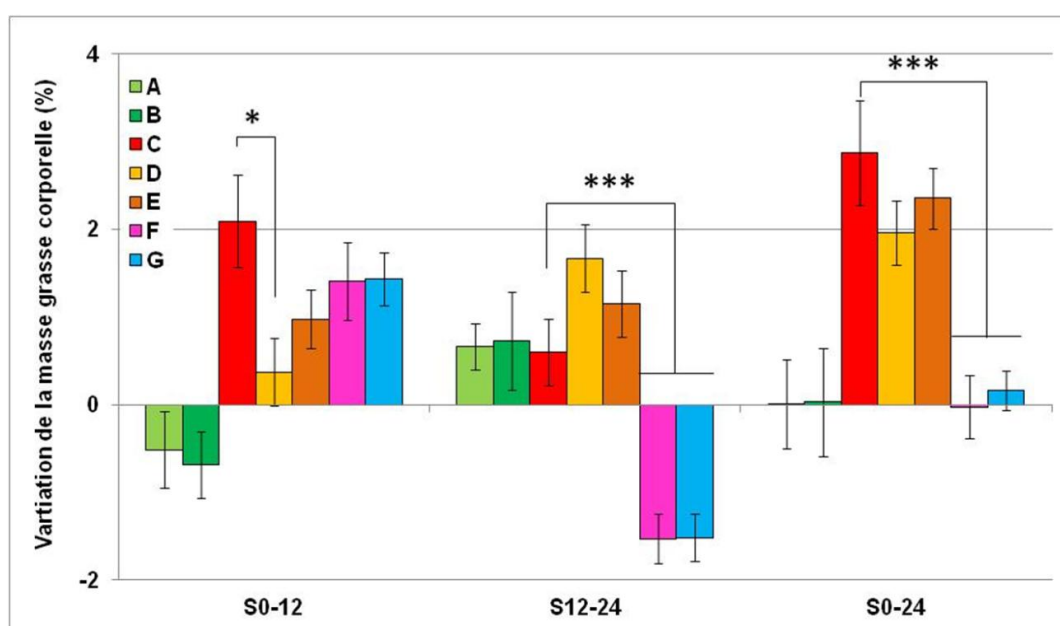


Figure 93 : Variations de la masse grasse selon le régime et la période

La figure 93 illustre clairement les deux périodes qui se sont succédé durant le programme nutritionnel. Suivons ainsi la variation de la masse grasse corporelle des souris des groupes A et B, qui maigrissent durant la période S0-12 et gagnent du tissu adipeux dans la période S12-24. De même, durant la 1^{ère} période, les souris du groupe D montrent une adiposité significativement moins augmentée ($p < 0,05$) que celles du groupe E grâce à la supplémentation en AGPI- $n-3$. Cet effet protecteur contre l'obésité semble par contre avoir totalement disparu durant la 2^{ème} période, puisque ce sont les souris sous régime enrichi en ces AGPI qui gagnent le plus de masse grasse. La succession de ces deux périodes fait qu'en considérant la variation d'adiposité sur les 24 semaines, aucun effet significatif ne peut être observé ni même suspecté en conséquence de la supplémentation par les AGPI- $n-3$.

Sans surprise enfin, nous avons constaté que la masse grasse évolue de façon très fortement corrélée ($p < 0,0001$) avec la masse corporelle, quel que soit le régime administré et le test statistique adopté (Tableau 14). En revanche, la masse grasse ne semble dépendre significativement de l'apport énergétique que pour les souris sous régimes hyperlipidiques C et E, au contraire des souris supplémentées par les AGPI- $n-3$ des groupes D et G, ce qui paraît soutenir les effets anti-obésité suggérés par les résultats illustrés ci-dessus, au moins durant la période S0-12. L'analyse des moyennes des groupes a d'ailleurs permis de corrélérer l'apport énergétique à l'adiposité des souris, plus fortement d'ailleurs durant la 1^{ère} moitié du programme nutritionnel (Figure 94).

Corrélation entre masse corporelle et masse grasse						Corrélation entre apports énergétiques et masse grasse					
	n	Régression linéaire		Corrélation de Spearman			n	Régression linéaire		Corrélation de Spearman	
		R ²	p	Rhó	p			R ²	p	Rhó	p
A	60	0,626	< 0,0001	0,801	< 0,0001	A	60	0,0169	0,2182	-0,161	0,2182
B	60	0,580	< 0,0001	0,697	< 0,0001	B	60	0,0003	0,9301	-0,012	0,9301
C	57	0,604	< 0,0001	0,761	< 0,0001	C	57	0,0406	0,0232	-0,304	0,0232
D	61	0,654	< 0,0001	0,864	< 0,0001	D	61	0,005	0,67	0,055	0,67
E	63	0,672	< 0,0001	0,863	< 0,0001	E	63	0,142	0,0009	-0,423	0,0009
F	69	0,762	< 0,0001	0,841	< 0,0001	F	69	0,0636	0,0234	-0,275	0,0234
G	69	0,675	< 0,0001	0,736	< 0,0001	G	69	0,0003	0,9771	0,003	0,9771

Tableau 14 : Évolution de la masse grasse et paramètres corrélés

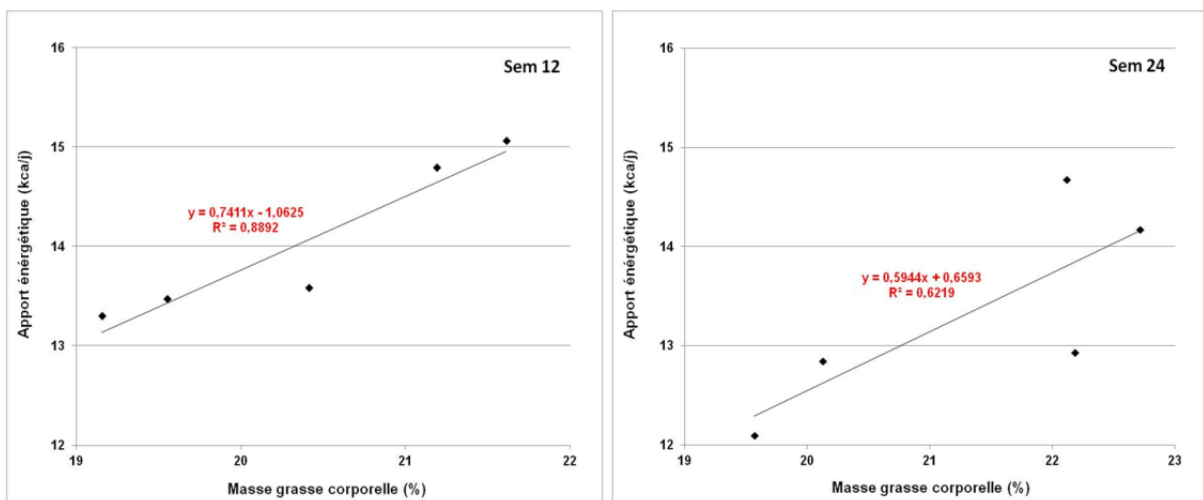


Figure 94 : Influence de l'apport énergétique sur la masse grasse des souris

Cette conclusion est aussi confortée par les résultats des souris F et G qui, après les 12 premières semaines, montrent une masse grasse accrue de façon comparable à celle des souris sous régime C. Ensuite, les souris F et G passées sous régime normocalorique A ou B retrouvent leur niveau initial de masse grasse, confirmant que la présence d'AGPI-*lc n-3* ne semble guère utile pour permettre le retour à la normale qui, comme la correction de la masse corporelle, s'effectue de façon suffisamment efficace par la seule réduction des apports caloriques. Toutefois, il ne peut être exclu que le niveau de surcharge pondérale relativement modéré (+7% de masse corporelle, +7,5% de masse grasse) obtenu après 12 semaines sous régime C puisse être aisément réversible, même sans supplémentation particulière. L'hypothèse initiale considérant que la supplémentation en AGPI-*lc n-3* puisse accélérer ou faciliter l'efficacité d'un régime normocalorique à normaliser la masse corporelle et la masse grasse devrait donc être réévaluée dans des conditions d'obésité plus marquées.

4. Paramètres métaboliques (cholestérol, triglycérides, glucose)

Tout au long des 6 mois et demi qu'a duré le programme nutritionnel de cette étude, nous avons mesuré à l'aide de kits de dosage toutes les 6 semaines les niveaux de différents marqueurs plasmatiques afin de pouvoir visualiser d'éventuels effets métaboliques liés aux régimes administrés. Dans le souci de simplifier les représentations graphiques sans appauvrir ou modifier les résultats, seules les valeurs des étapes clés (0, 12 et 24 semaines) du programme ont été indiquées.

a. Cholestérolémie

Les taux de cholestérol plasmatique mesurés ont montré des valeurs et des variations significatives très fortement liées à la nature et surtout à la phase du régime, ces deux variables exerçant leur influence aussi bien individuellement qu'en interaction (Tableau 15).

ANOVA	Cholestérol		Variation de cholestérol	
	Sem 0-24		Sem 0-24	
	F	p	F	p
Nature du régime	55,916	< 0,0001	13,743	< 0,0001
Phase du régime	921,925	< 0,0001	807,243	< 0,0001
Nature x Phase	23,432	< 0,0001	20,921	< 0,0001

Tableau 15 : Évolution de la cholestérolémie (ANOVA à 2 facteurs)

Quel que soit le régime administré, les taux de cholestérol plasmatique ont tous été augmentés très significativement ($p < 0,001$) dès la 12^e semaine, même avec un apport très faible (limité au seul 1% de saindoux) de cholestérol exogène par le régime A ou B, puis se sont stabilisés entre la 12^e et la 24^e semaine (Figures 95 et 96). Les AGPI-*lc n-3* présents dans le régime B n'ont produit aucune élévation supplémentaire du cholestérol plasmatique, mais n'ont pas non plus permis de limiter cette augmentation. Ce résultat peut donc s'expliquer principalement par l'activation de la biosynthèse hépatique de cholestérol par les ingrédients du régime A, en particulier les composés présents dans le saindoux ou les huiles végétales.

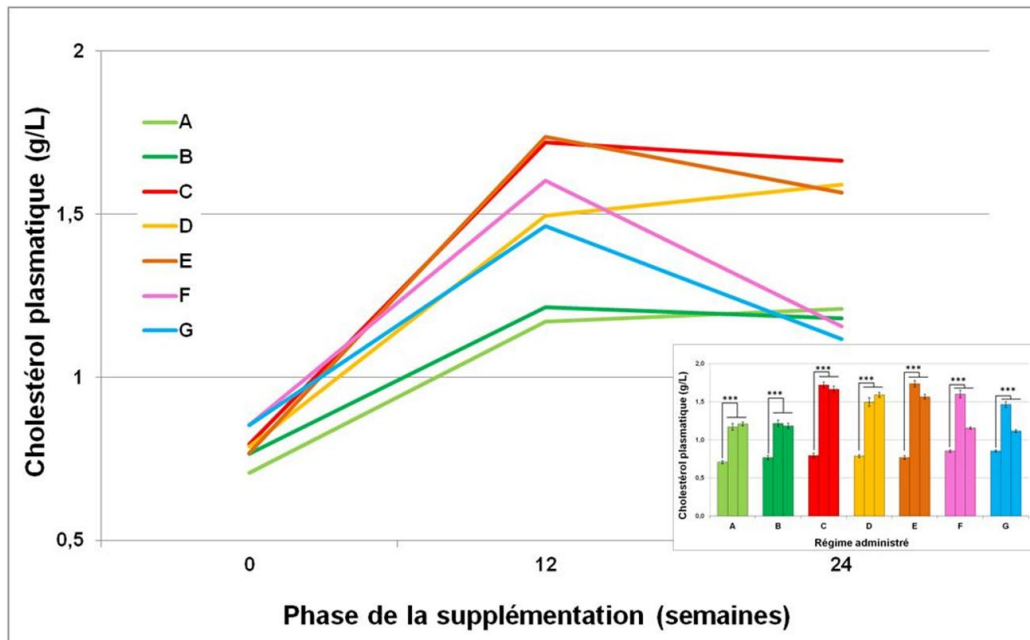


Figure 95 : Évolution de la cholestérolémie durant le programme nutritionnel

En insert : moyennes ± SEM du groupe de souris à Sem 0, 12 et 24 (de gauche à droite pour chaque massif)

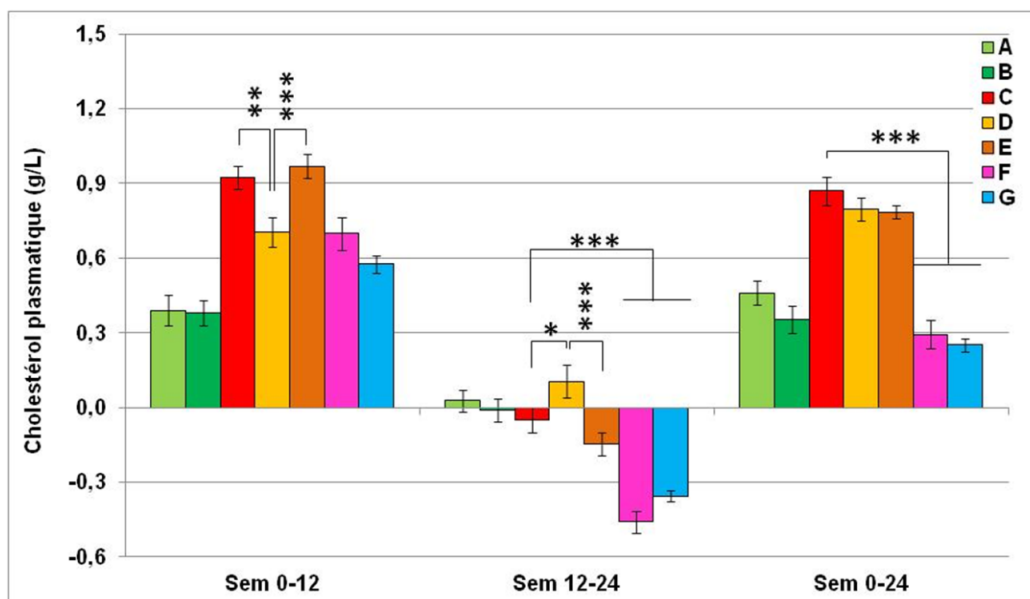


Figure 96 : Variations de la cholestérolémie selon le régime et la période

Après 24 semaines, les niveaux de cholestérol plasmatique des souris sous régime hypercalorique C, D ou E (contenant au moins 0,15% de cholestérol ajouté comme tel, sans compter l'apport par le saindoux estimé entre 0,02 et 0,04%) ont évidemment augmenté de façon beaucoup plus marquée que ceux des souris sous régime normocalorique. Mais cette augmentation concerne surtout les 12 premières semaines, suggérant à nouveau un changement métabolique sous l'effet de la phase du régime (Tableau 16).

Deux différences notables ont pu être constatées dans le profil d'évolution de ce paramètre (Figures 95 & 96). La première de ces différences concerne le taux de cholestérol plasmatique des

souris sous régime D durant 12 semaines, augmenté (+100%) d'un niveau très significativement inférieur ($p < 0,01$) à celui des souris sous régime C. Ce résultat reflète certainement l'effet des AGPI-*lc n-3*, et suggère des propriétés hypocholestérolémiantes pour le DHA (Harris, 1989 ; Holub, 2009 ; Zhang *et al.*, 2010 ; Tang *et al.*, 2012). Ces propriétés sont à associer aux effets bénéfiques connus du DHA sur les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, comme l'ont relevé de nombreuses études interventionnelles (Sadovsky & Kris-Etherton, 2009 ; Zuliani *et al.*, 2009 ; Yurko-Mauro, 2010 ; Skulas-Ray *et al.*, 2011). Le cholestérol étant aussi l'un des facteurs de risque de la MA, la préservation de taux sanguins limités liée à la supplémentation en AGPI-*lc n-3* doit offrir un bénéfice cumulé essentiel pour la prévention de ces 2 types de maladies liées au vieillissement. Par contre, durant la période S12-24, seules les souris du groupe D ont continué à accroître leur cholestérolémie.

La seconde différence notable réside dans le taux de cholestérol plasmatique des souris sous régime E qui, après 12 semaines, ont accumulé autant de cholestérol que les souris sous régime C (+133%). Les composés de l'huile d'olive vierge extra ne semblent donc exercer aucun effet visible sur le cholestérol plasmatique, voire même annihilent les effets bénéfiques des AGPI-*lc n-3* comme nous l'avions vu précédemment pour la masse corporelle et le taux de masse grasse des souris. Cette interprétation doit néanmoins être modulée par le fait que le taux de cholestérol plasmatique des souris E a significativement diminué entre les 12^e et 24^e semaines, rejoignant ainsi le niveau de celui des souris D qui a, lui, plutôt augmenté dans le même temps. À la 24^e semaine, le taux des souris D et E est resté plus faible ($p < 0,05$) que celui des souris C, mais très supérieur ($p < 0,0001$) à celui des souris sous régime A ou B. Il est donc possible que les effets bénéfiques éventuels des polyphénols et autres ingrédients spécifiques de l'huile d'olive vierge extra, utilisée à la concentration d'environ 5% dans l'aliment E, puissent être plus tardifs que ceux des AGPI-*lc n-3* et n'être observés qu'au terme d'un traitement plus long. Les taux de cholestérol mesurés à la 26^e semaine confortent l'évolution observée entre la 12^e et la 24^e semaine (Figures 96 et 97). En effet, probablement sous l'effet de l'huile d'olive vierge extra, les souris sous régime E ont continué à baisser significativement leur taux de cholestérol pour atteindre des niveaux équivalents à ceux retrouvés chez les souris sous régime A ou B sans cholestérol. Ces résultats sont en accord avec d'autres obtenus en supplémentant des animaux sous régime enrichi en cholestérol par des fractions phénoliques extraites de l'huile d'olive ou des feuilles d'olivier (Fki *et al.*, 2007 ; Jemai *et al.*, 2008 ; Machowetz *et al.*, 2008). Cet effet conduit certainement à la différence la plus spectaculaire constatée entre le régime E et les autres régimes hyperlipidiques dans le cadre de cette étude.

Enfin, les taux de cholestérolémie des souris des groupes F et G ont augmenté après les 12 semaines sous régime C, puis diminué après leur passage sous régime A ou B (Figures 95 et 96). Comme pour les paramètres précédents, la supplémentation en AGPI-*lc n-3* ne semble pas influencer sur la normalisation du taux de cholestérol, visiblement plus prompt à augmenter (+90%) qu'à diminuer (-30%). Ceci suggère que les AGPI-*lc n-3* contribuent davantage à éviter ou retarder l'hypercholestérolémie des souris qu'à la combattre.

À l'aide d'un test *t* de Student considérant les valeurs appariées, nous avons suivi les taux de cholestérol individuels de chaque souris de chaque groupe-régime durant les diverses périodes identifiées dans le programme nutritionnel. Les résultats indiquent des variations significatives ($p < 0,0001$) de la cholestérolémie pour chaque régime considérant les 24 semaines du programme, ainsi que sur la période S0-12. À l'inverse, comme l'illustrent les profils calculés à partir des moyennes (Figure 95), les taux mesurés chez les souris des groupes A, B, C et D ne sont pas significativement affectés durant la période S12-24.

L'analyse statistique des taux de cholestérol moyens par groupe par un test *t* de Student non apparié nous a conduits à constater que la cholestérolémie des groupes A et B, comparable sur toute la durée de l'étude, est d'un niveau significativement inférieur à celle des groupes sous régimes hyperlipidiques, excepté sur la période S12-24. Parmi ces derniers groupes, nous observons que, seulement lors de la période S0-12 et conformément à nos commentaires ci-dessus, les souris sous régime D diffèrent nettement ($p < 0,002$) des souris des groupes C et E qui, par contre, ne se distinguent jamais entre elles. Enfin, les souris des groupes F et G conservent des taux moyens similaires sur toutes les périodes.

L'ensemble de ces résultats confirment les conclusions préalables sur le bénéfice hypocholestérolémiant des AGPI-*lc n-3* et l'absence d'effet visible sur la normalisation des profils des souris F et G lors de la 2^e moitié du programme nutritionnel.

En différenciant le cholestérol total de la forme liée aux HDL, nous avons tout d'abord pu vérifier que les souris contrôles à T0 présentaient bien une proportion de cholestérol supérieure dans les HDL que dans les autres lipoprotéines (LDL en majorité), avec environ 58% de Chol-HDL (Figure 97 & 98).

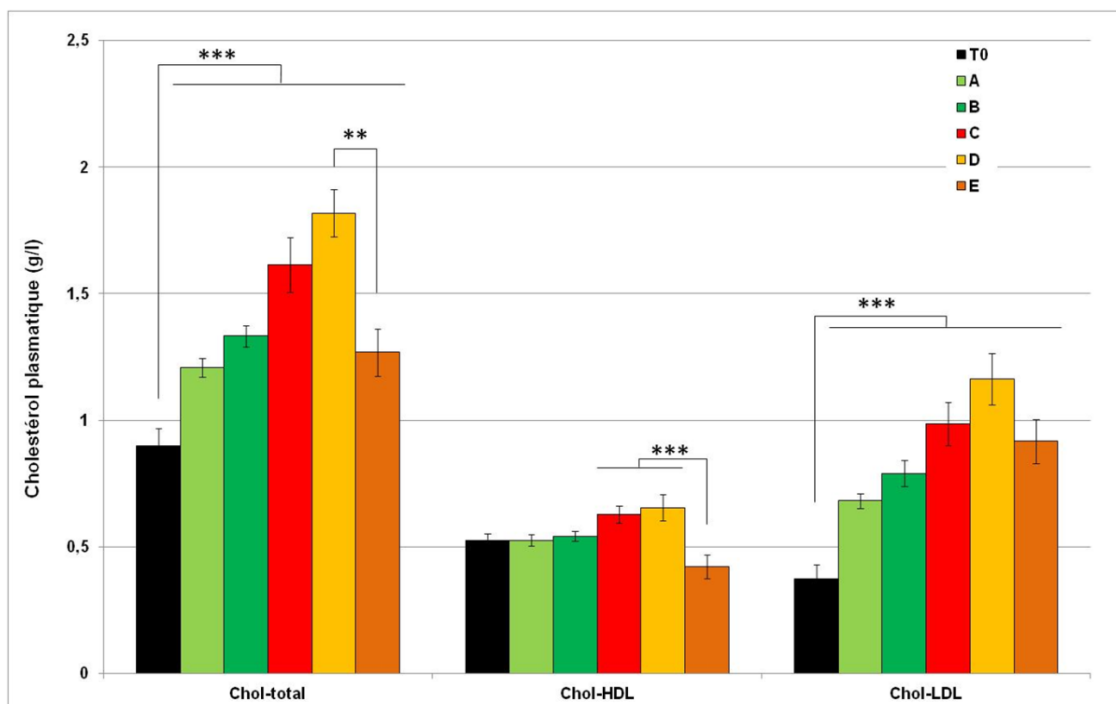


Figure 97 : Distribution du cholestérol au terme du programme nutritionnel

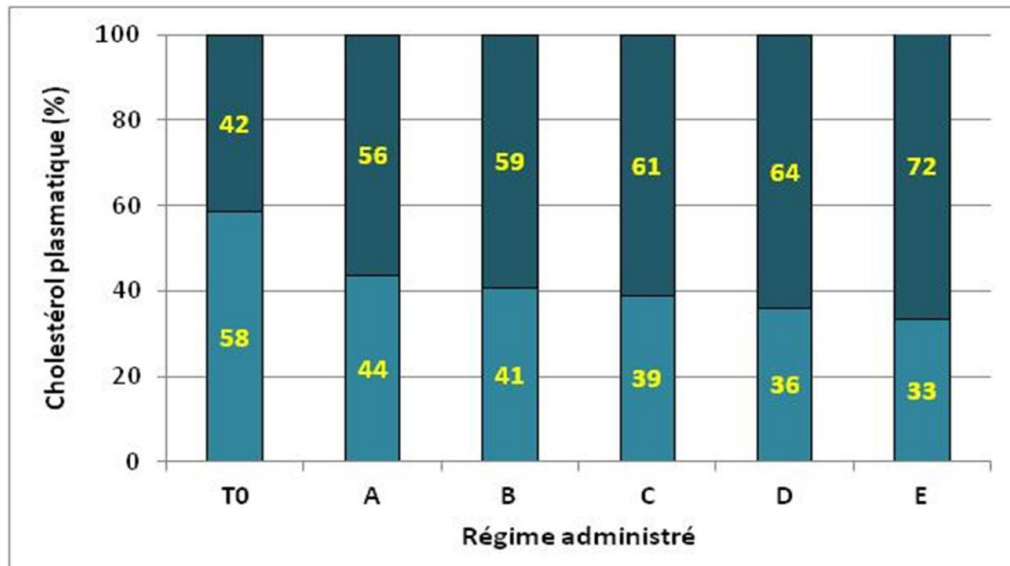


Figure 98 : Distribution du cholestérol au terme du programme nutritionnel

Les valeurs indiquent les proportions moyennes de cholestérol dans les HDL (en bas) et LDL (en haut).

Les valeurs de cholestérolémie mesurées à la 26^e semaine chez les souris de tous les groupes régimes étaient accompagnées d'une augmentation significative de la concentration plasmatique de Chol-LDL, sans modification significative de celle de Chol-HDL (Figure 97). Ceci a eu pour effet d'élever la proportion de Chol-LDL, la proportion de Chol-HDL ayant chuté aux alentours de 40% et même moins chez les souris sous régime hyperlipidique (Figure 98).

Ce changement de profil lipoprotéique en conséquence d'un apport alimentaire de cholestérol chez les rongeurs est déjà connu de longue date (Kushwaha *et al.*, 1978 ; Tsuda *et al.*, 1983). Mais il faut constater que cette inversion de la répartition du cholestérol entre HDL et LDL est aussi observé chez les souris sous régime A et B, ce qui outre l'éventuelle activation de la synthèse de cholestérol endogène évoquée plus haut, il est fort possible que soit survenue une modification du trafic ou du métabolisme lipidique chez les souris sous l'effet de l'âge et/ou de la durée du régime, l'hypercholestérolémie observée pouvant en être l'une des conséquences. Il faut d'ailleurs noter aussi que si les souris sous régime E avaient un taux de cholestérol plus faible que celles sous régime D ou E au moment de leur sacrifice (26^e semaine), cette différence concernant à la fois les proportions de Chol-HDL et Chol-LDL, ce qui a renforcé encore l'inversion du profil lipoprotéique de répartition du cholestérol. Cet effet s'oppose à plusieurs articles publiés sur les bénéfices du régime méditerranéen (Gorinstein *et al.*, 2002 ; Covas *et al.*, 2006 ; Estruch *et al.*, 2006 ; Damasceno *et al.*, 2011) et mériterait vérification. Mais s'il était confirmé, il pourrait relativiser l'intérêt de l'effet hypocholestérolémiant relevé précédemment et dans une littérature fournie. Enfin, la supplémentation en AGPI-*lc n-3* n'a quant à elle pas semblé pouvoir empêcher ou limiter cette inversion de profil. Cette observation a également été rapportée chez l'homme, la consommation d'AGPI-*lc n-3* n'ayant pu modifier ces facteurs lipidiques de risque cardiovasculaire (Egert *et al.*, 2009 ; Thusgaard *et al.*, 2009 ; García-Alonso *et al.*, 2011).

b. Triglycéridémie

L'autre paramètre biologique important lié au métabolisme lipidique est le taux de triglycérides (TG) plasmatiques. Alors que tous les groupes-régimes de souris ont débuté l'étude avec une cholestérolémie moyenne comparable, nous avons constaté que ces groupes présentaient, pour une raison inexplicable, des valeurs de triglycéridémie assez différentes (Tableau 16 & Figure 99). Nous avons donc représenté l'évolution de ce paramètre en % de variation par rapport aux valeurs à T0 (Figures 99 & 100).

ANOVA	Triglycérides		Variation des triglycérides	
	Sem 0-24		Sem 0-24	
	F	p	F	p
Nature du régime	3,776	0,0011	0,772	0,5926
Phase du régime	24,822	< 0,0001	55,696	< 0,0001
Nature x Phase	3,392	< 0,0001	5,083	< 0,0001

Tableau 16 : Évolution de la triglycéridémie (ANOVA à 2 facteurs)

L'analyse de variance ANOVA à 2 facteurs montre que sur les 24 semaines du programme nutritionnel, les variations des taux de TG ne semblent pas influencées individuellement par la nature du régime, alors que la phase du régime les influe très nettement. Ceci souligne à nouveau l'impact déterminant de la période sur nos résultats.

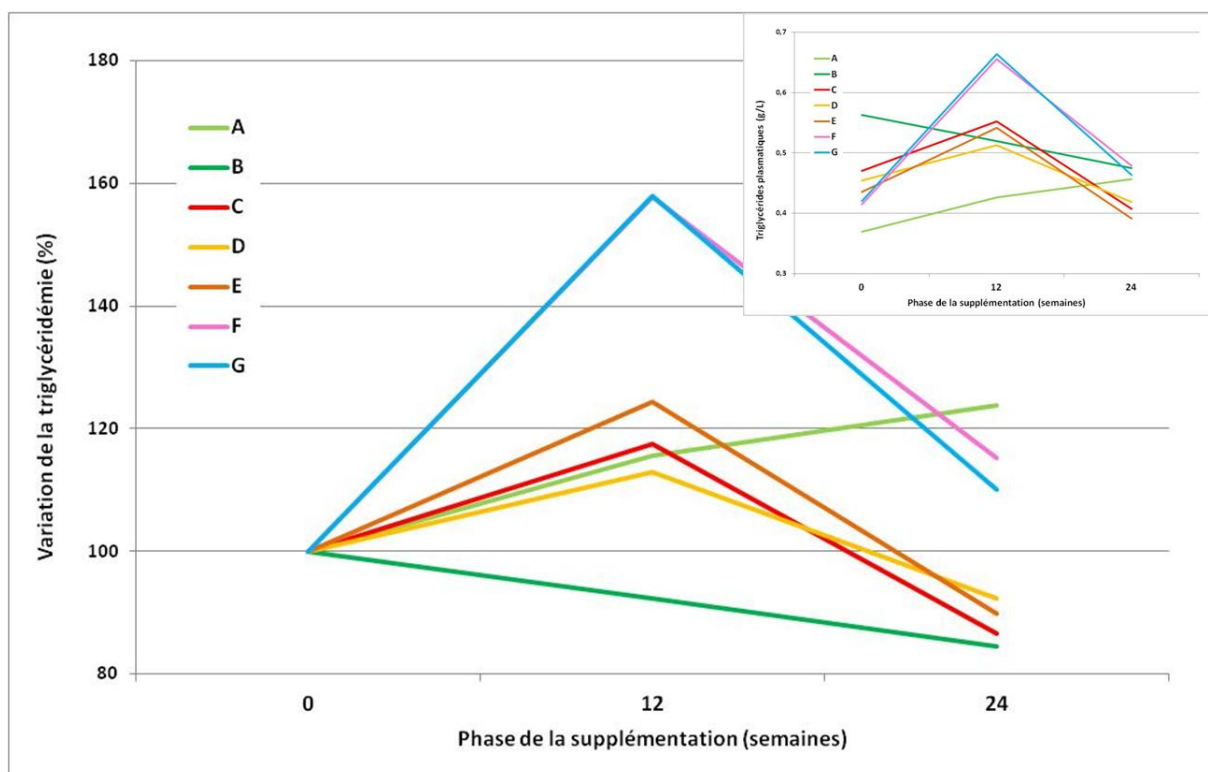


Figure 99 : Évolution de la triglycéridémie durant le programme nutritionnel

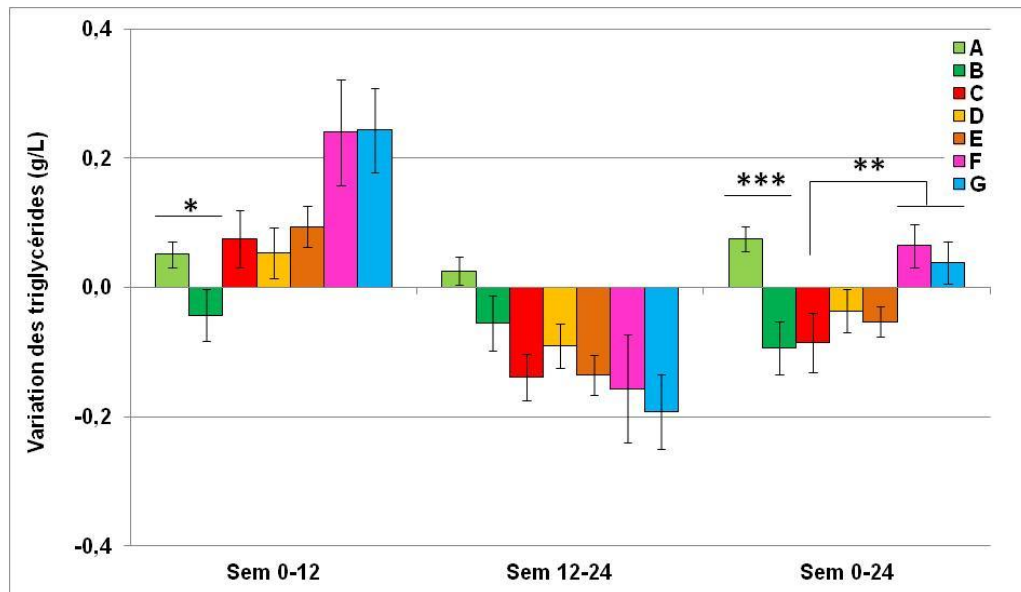


Figure 100 : Variations de la triglycéridémie selon le régime et la période

L'évolution de la triglycéridémie chez les souris sous régime hyperlipidique C, D ou E décrit des profils diphasiques sur toute la durée du programme nutritionnel, alors que les souris sous régime normolipidique montrent une triglycéridémie monophasique constante (Figures 99 & 100). Par ailleurs, après 12 semaines, les souris des groupes F et G montrent une hausse importante de leurs taux de TG qui les distingue inexplicablement de celles du groupe C, pourtant toutes sous le même régime et avec, rappelons-le, une consommation quotidienne moyenne similaire (Figure 84). Après 12 semaines, les souris F et G montraient une augmentation des TG plasmatiques de 63%, pour seulement 17% pour les souris C. Cette augmentation fait suite à une diminution tout aussi spectaculaire, les groupes F et G recouvrant à la 24^e semaine une triglycéridémie voisine, proche de la valeur initiale à T0. Il faut noter que les souris G passées sous régime B semble normaliser un peu plus vite leur triglycéridémie que les souris F passées sous régime A, indiquant un effet bénéfique de la supplémentation par les AGPI-*lc n-3*. Néanmoins, la surprise vient du fait que cette baisse est aussi visible pour les souris C, qui ont persisté sous le même régime hyperlipidique (~20% de matière grasse) au contraire des autres passées sous régime normolipidique (~5% de matière grasse). Il faut noter ici que les concentrations plasmatiques de cholestérol, de triglycérides et de glucose ont été mesurées à partir des mêmes échantillons sanguins, prélevés sans contrôle préalable de l'état de jeûne. Il n'est donc pas exclu que des variations puissent s'être glissées et rendre difficiles la comparaison des valeurs de la triglycéridémie dont on sait la sensibilité particulière à l'état nutritionnel.

En comparaison aux souris sous régime C qui après 12 semaines ont augmenté leur taux de TG plasmatiques de 17%, celles sous régime D n'ont élevé ce taux que de 13%, alors que celles sous régime E l'ont élevé de 24% (Figures 99 & 100). Même si les valeurs moyennes ne sont pas significativement différentes entre elles, elles pourraient laisser penser que les AGPI-*lc n-3* et les polyphénols de l'huile d'olive n'ont aucun effet sur les TG, ce qui est en désaccord avec plusieurs

articles scientifiques ayant testé des polyphénols d'olive et autres, seuls ou en association avec des huiles de poisson (Ramírez-Tortosa *et al.*, 1999 ; Machowetz *et al.*, 2008 ; Oi-Kano *et al.*, 2008 ; Suh *et al.*, 2011 ; Vafa *et al.*, 2011). Ceci suggère que sur les paramètres lipidiques du sang en particulier, les AGPI-lc *n*-3 et les polyphénols puissent avoir interagi, annihilant ainsi mutuellement leurs effets bénéfiques (Covas *et al.*, 2006).

Toutefois, les souris B qui inexplicablement présentaient un taux de TG significativement supérieur au début de l'expérience ont terminé l'étude avec un taux très voisin de celui des souris A. Utilisés seuls, les AGPI-lc *n*-3 semblent donc pouvoir exercer un effet bénéfique effectif sur ce paramètre clé du risque cardiovasculaire, ce qui est en accord avec la prescription de supplémentation par des huiles de poisson ou par leurs acides gras spécifiques chez les patients à forte hypertriglycéridémie (Sadovsky & Kris-Etherton, 2009 ; Zuliani *et al.*, 2009 ; Yurko-Mauro, 2010 ; Skulas-Ray *et al.*, 2011 ; Al-Gayyar *et al.*, 2012 ; Koh *et al.*, 2012). Mais comme nous l'avons supposé pour l'hypercholestérolémie, ces AGPI-lc *n*-3 semblent pouvoir prévenir l'hypertriglycéridémie plus efficacement qu'ils ne paraissent capables de la corriger. Il faut néanmoins rappeler que la souris est une espèce animale particulière qui se distingue de l'homme par le fait qu'elle accumule relativement moins les TG plasmatiques, ce qui pourrait contribuer à sa faible sensibilité aux maladies cardiovasculaires. De toute façon, les niveaux d'hypertriglycéridémie mesurés sont trop modestes pour permettre d'évaluer de façon optimale si les différents régimes testés dans cette étude peuvent effectivement corriger ce paramètre.

Les différences des taux de TG dans les souris selon les périodes et le régime administré ont été analysées à l'aide du test *t* avec ou sans appariement comme nous l'avons décrit pour le cholestérol. Les résultats obtenus sont conformes à ceux attendus de l'analyse des profils de la Figure 98, notamment l'absence de différence significative entre les groupes sous régimes hyperlipidiques, et ce quelle que soit la période considérée, S0-12, S12-24 ou S0-24.

c. Glycémie

Le dernier paramètre métabolique mesuré au long du programme nutritionnel est la glycémie. Les résultats obtenus et les profils tracés indiquent que le glucose plasmatique est un paramètre que cette étude n'a modifié que de façon modeste (< 10% en moyenne, entre 95 et 119% par rapport à la glycémie à T0), mais significative (Tableau 17 & Figures 101 & 102).

ANOVA	Glucose		Variation du glucose	
	Sem 0-24		Sem 0-24	
	F	p	F	p
Nature du régime	12,476	0,0011	1,435	0,2024
Phase du régime	11,418	< 0,0001	7,422	0,0070
Nature x Phase	2,712	0,0016	3,482	0,0027

Tableau 17 : Évolution de la glycémie (ANOVA à 2 facteurs)

L'analyse ANOVA a permis de montrer une influence forte de la phase du régime sur la glycémie et ses variations, tandis que la nature du régime semble n'avoir exercé aucune influence sur les variations du glucose plasmatique, en tout cas pas indépendamment de la phase. Aucune différence ne semble donc pouvoir caractériser un régime ou un autre et nous n'avons pas pu définir de tendance fiable suggérant l'influence claire d'un régime particulier, de tel ingrédient ou de tel autre sur la glycémie des souris.

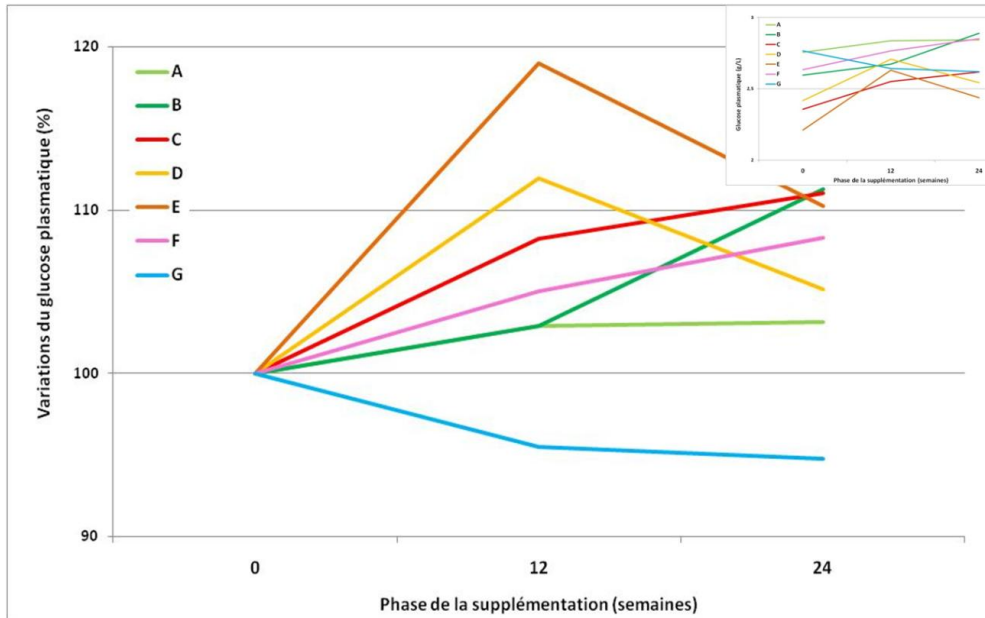


Figure 101 : Évolution de la glycémie durant le programme nutritionnel
En insert : les valeurs de glycémie effectivement mesurées

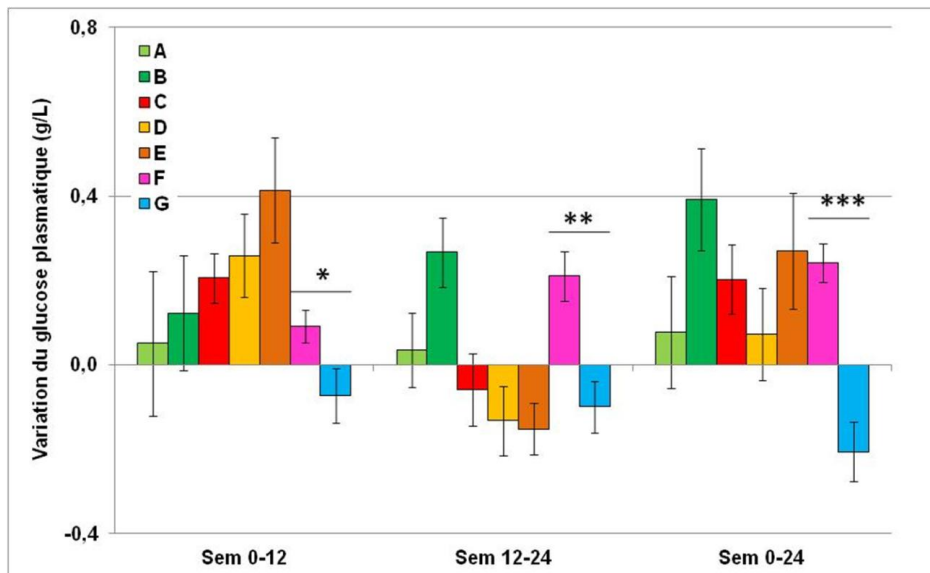


Figure 102 : Variations de la glycémie selon le régime et la période

Les seules différences significatives apparues entre les résultats de glycémie des différents groupes de souris concernent les groupes F et G dont les taux et les variations ont décrit des profils opposés dès la 1^{ère} période de 12 semaines du programme nutritionnel (Figure 102). Cette observation est plutôt

surprenante dans la mesure où, après une répartition initiale totalement aléatoire, les souris de ces deux groupes étaient soumises au même régime C. Il nous paraît difficile et inutile de spéculer pour tenter d'expliquer de si faibles variations.

Pour conclure sur les paramètres métaboliques, il nous a paru intéressant de rechercher si les variations de masse corporelle et de masse grasse pouvaient être corrélées à celles des paramètres sanguins. Nous avons distingué 2 phases, *i.e.* avant et après la 12^e semaine de régime, visibles aussi bien dans les 2 séries de souris âgées de 9 ou 12 mois à la période charnière. Nous avons donc mené cette recherche de corrélations aux 12^e et 24^e semaines en considérant les données obtenues sur la totalité des souris, tous groupes A à F confondus (Tableau 18). Les résultats obtenus par le test de corrélation par rangs de Spearman n'apportent pas d'arguments nouveaux pour tenter d'expliquer l'existence et le sens des 2 phases qui se sont succédé lors du programme nutritionnel de cette étude. En effet, assez peu d'associations semblent lier entre eux les paramètres biologiques et métaboliques analysés précédemment que ce soit à la 12^e ou à la 24^e semaine. Toutefois, même avec un risque d'erreur supérieur à 0,05, les corrélations semblent globalement plus robustes, avec des valeurs supérieures pour le facteur ρ (rhô) de corrélation à la 24^e semaine. Il faudra néanmoins s'interroger sur la raison de l'inversion de certaines, positives à la 12^e semaine, négatives à la 24^e semaine. Ceci suggère que les changements constatés entre le milieu et la fin du programme nutritionnel puissent ne pas refléter une dérégulation de l'homéostasie, mais plutôt de l'intervention de processus métaboliques activés et contrôlés en réponse aux régimes administrés et qu'il serait certainement intéressant d'étudier de manière plus approfondie. Mais il semble difficile d'interpréter les résultats de l'étude *in vivo* comme étant en continuité d'un bout à l'autre du programme nutritionnel.

S24 \ S12	Masse corporelle		Masse grasse		Cholestérolémie		Triglycéridémie		Glycémie	
	Rhò	P	Rhò	P	Rhò	P	Rhò	P	Rhò	P
Masse corporelle			0,714	0,08	0,607	0,137	0,487	0,233	-0,393	0,336
Masse grasse	0,739	0,07			0,5	0,221	0,685	0,094	0,5	0,221
Cholestérolémie	0,679	0,097	0,613	0,133			0,414	0,31	0,643	0,115
Triglycéridémie	-0,739	0,07	-1	0,014	-0,613	0,133			0,883	0,031
Glycémie	-0,757	0,064	-0,927	0,023	-0,505	0,217	0,927	0,023		

Tableau 18 : Corrélations identifiées entre les paramètres biologiques et métaboliques
Test de corrélation par rangs de Spearman ; résultats à la 12^e (ou 24^e) semaine sur (ou sous) la diagonale

5. Compositions érythrocytaires en acides gras

Bien que diverses publications aient déjà démontré la biodisponibilité des AGPI-*lc n-3* de l'huile de poisson, il nous fallait étudier comment ces AG étaient assimilés durant le programme nutritionnel de notre étude et quelles pouvaient en être les conséquences. Pour cela, nous avons déterminé par CPG les compositions plasmatiques en AG, très majoritairement d'origine érythrocytaire, sur trois mesures (à T0, aux semaines 12 et 24) et recherché en fin de l'étude l'éventualité de conditions pro-inflammatoires ou pro-oxydantes en conséquence.

Commençons cette analyse par le suivi trimestriel des AG érythrocytaires des souris sous les différents régimes testés, la littérature et nos résultats de la Partie A ayant mis en évidence que les teneurs relatives en DHA dans les membranes érythrocytaires sont de bons marqueurs de la biodisponibilité de cet AGPI-lc. Étant donné les volumes des échantillons sanguins prélevés pour ce suivi, nous ne pouvions mesurer que les taux de DHA cellulaire total, sans chercher à différencier les formes de phospholipides concernées par l'enrichissement attendu. Mais cette information semble suffire amplement pour vérifier l'incorporation de l'AGPI dans les différentes conditions de régime.

Les résultats indiquent clairement une augmentation des teneurs des membranes érythrocytaires en DHA chez les souris supplémentées en huile de poisson, mais seulement durant la première moitié du programme nutritionnel, ces taux s'effondrant ensuite lors de la 2^e moitié (Figure 103). Logiquement, l'analyse ANOVA a identifié une influence de la nature et de la phase du régime sur les taux de DHA, tandis que les variations de ces taux ne semblent sensibles qu'à la phase du régime, seule ou en interaction avec la nature (Tableau 19).

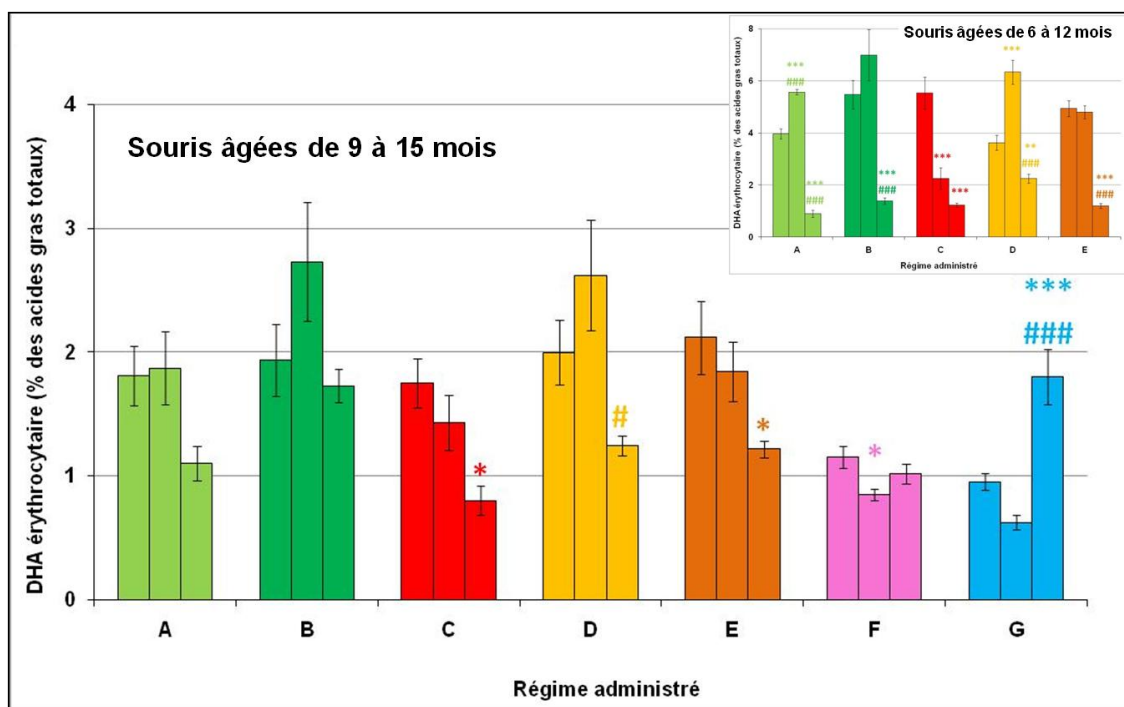


Figure 103 : Évolution des taux de DHA érythrocytaire

Pour chaque massif, de gauche à droite, T0, S12 et S24 ; différence significative par rapport à T0, * ; à S12, #

ANOVA	DHA érythrocytaire (%)		Variations du DHA érythrocytaire	
	Sem 0-24		Sem 0-24	
	F	p	F	p
Nature du régime	5,766	0,0011	1,561	0,1689
Phase du régime	3,985	0,0207	6,938	0,0101
Nature x Phase	2,297	0,0106	6,162	< 0,0001

Tableau 19 : Évolution des taux de DHA érythrocytaire (ANOVA à 2 facteurs)

Nous nous attendions à observer les taux d'enrichissement en DHA érythrocytaire les plus élevés chez les souris supplémentées en huile de poisson, mais cela n'a été que partiellement vérifié. En effet, après 12 semaines, seules les souris sous régime B et D ont bien montré une teneur moyenne en DHA supérieure par rapport aux teneurs initiales, soit une augmentation nette respective de 41 et 31%, mais non significative ($p = 0,060$ et $0,064$ respectivement). Dans le même temps, les érythrocytes des souris sous régime E n'ont en revanche montré aucune variation de leur teneur en DHA. Ce résultat ne signifie pas l'absence d'effet, puisque la formulation spécifique de ce régime est parvenue à amoindrir la baisse du DHA observée chez les souris des groupes C, F et G sous régime C (Figures 103 & 104).

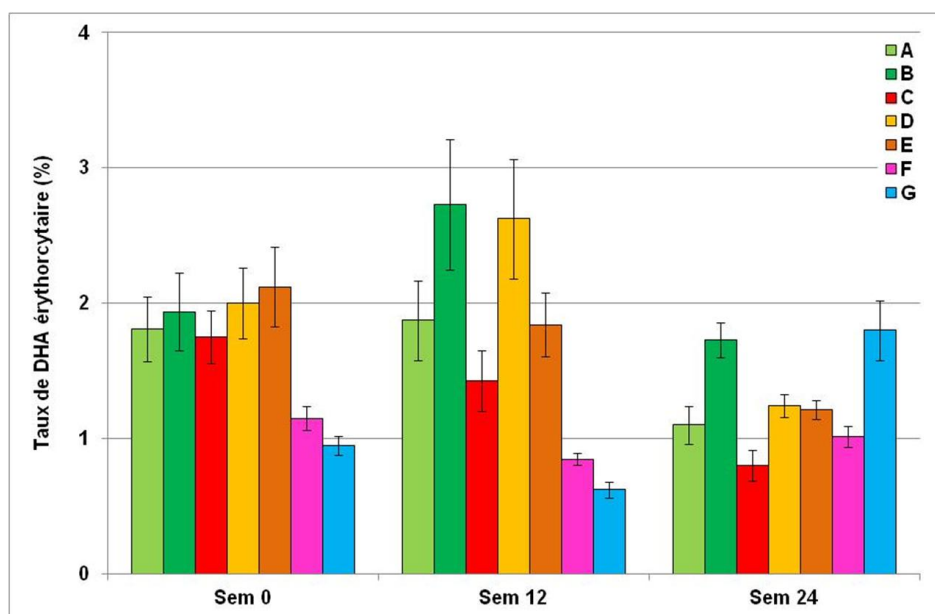


Figure 104 : Évolution des taux de DHA érythrocytaire selon la période

Le DHA érythrocytaire a suivi les mêmes profils d'évolution chez les souris âgées de 6 mois ou de 9 mois à T0, mais avec des teneurs moyennes en DHA doubles chez les souris les plus jeunes à T0. Ceci suggère donc que les composés spécifiques de l'huile d'olive vierge extra puissent affecter la biodisponibilité ou le métabolisme des AGPI- $n-3$, jusqu'à limiter leur incorporation dans les membranes biologiques. Une telle situation pourrait alors expliquer les effets antagonistes constatés précédemment sur les paramètres biologiques et métaboliques entre les ingrédients de l'huile de poisson et de l'huile d'olive vierge extra. Plusieurs auteurs ont déjà rapporté que l'index $n-3$ est sensible au facteur âge (Sands *et al.*, 2005 ; O'Sullivan *et al.*, 2011), mais une autre hypothèse semble pouvoir être proposée pour expliquer les différences surprenantes constatées sur les divers effets associés aux régimes D et E.

Les composés spécifiques de l'huile d'olive vierge extra apportent une plus grande complexité au régime E comparativement au régime D enrichi en huile de poisson. Ce même constat que des effets bénéfiques, normalement opérés par un nutriment administré seul comme le DHA, puissent être annihilés, voire inversés, lorsque cet ingrédient est associé à d'autres dans des formulations particulières visant des synergies biologiques, a déjà été rapporté dans la littérature. Des interactions physiologiques

ont ainsi été évoquées entre le DHA et d'autres acides gras en mélanges ou entre le DHA et les ingrédients de la formule Peptamen (Nestlé Nutrition), expliquant l'absence de l'effet bénéfique attendu du DHA sur la voie amyloïdogène et l'accumulation de plaques amyloïdes dans des souris transgéniques TgCRND8 modèles de la MA, nécessitant une attention particulière à l'heure de définir des combinaisons nutritionnelles préventives (Gu *et al.*, 2010 ; Amtul *et al.*, 2011a & 2011b ; Gu & Scarmeas, 2011). D'autres études seront donc nécessaires pour expliquer les différences constatées dans notre étude, recherchant d'éventuelles interactions pouvant altérer en conséquence la fonctionnalité des AGPI-*lc n-3* alimentaires en affectant leur biodisponibilité, leur incorporation, leur turnover, leur métabolisme, leur stabilité moléculaire, etc.

Une autre caractéristique inattendue de l'évolution des profils érythrocytaires de DHA est la chute considérable des teneurs moyennes à S24 (-50% par rapport à la moyenne de S12, jusqu'à 80% même chez les souris âgées de 6 mois à T0). Cette chute a été constatée chez les souris de tous les groupes-régimes sauf les souris G qui montrent un enrichissement très significatif (300% par rapport à la S12) et attendu en conséquence de leur passage sous régime B (Figures 103 à 105). Ces résultats confirment cette « rupture » physiologique ou métabolique mise en avant d'après les résultats précédents et qui faisait apparaître la durée de 6 mois de notre étude comme la succession de 2 phases d'environ 12 semaines chacune. Le fait que cette rupture puisse survenir aussi bien chez les souris âgées de 9 ou de 12 mois suggère qu'il ne s'agit pas d'un événement lié à l'âge des souris, mais plutôt d'une réponse ou d'une réaction à nos traitements que nous n'avions suspectée à aucun moment.

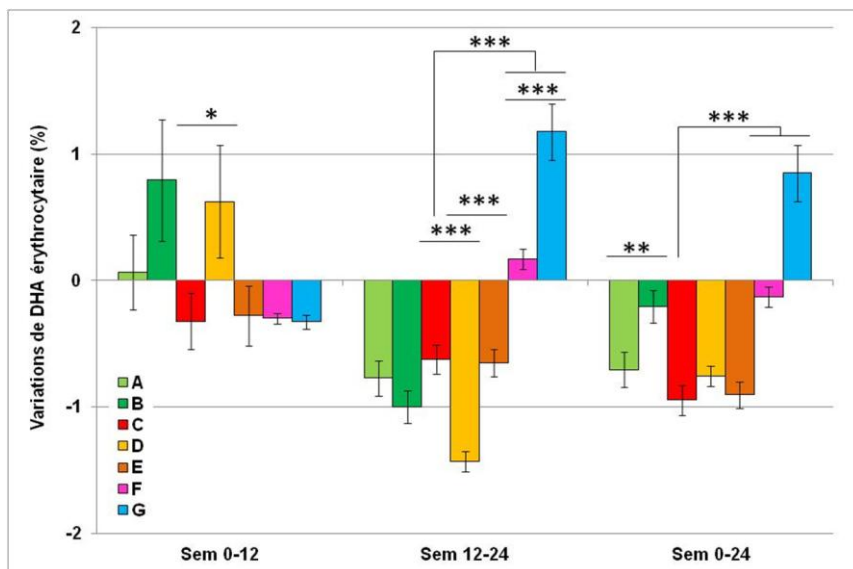


Figure 105 : Variations des taux de DHA érythrocytaire selon le régime et la période

Le dosage simultané par CPG des 10 principaux acides gras a permis de vérifier que le profil d'évolution des teneurs érythrocytaires relatives en DHA et EPA (*n-3*) varie inversement de celui de l'ARA et des autres AGPI *n-6* dont les teneurs relatives sont augmentées sous régime C par rapport aux souris supplémentées en AGPI-*lc n-3* (Figures 106 à 108). Ces variations sont apparues fortement

influencées par la nature du régime, mais pas par la période (Tableau 20). Ainsi, le ratio des AGPI $n-6/n-3$ diminue de 9 en moyenne à T0 à 4-6 à S12, sauf chez les souris sous régime C, avant de retrouver son niveau initial, sauf chez les souris du groupe B qui ont gardé le ratio le plus faible et significativement inférieur aux souris du groupe A.

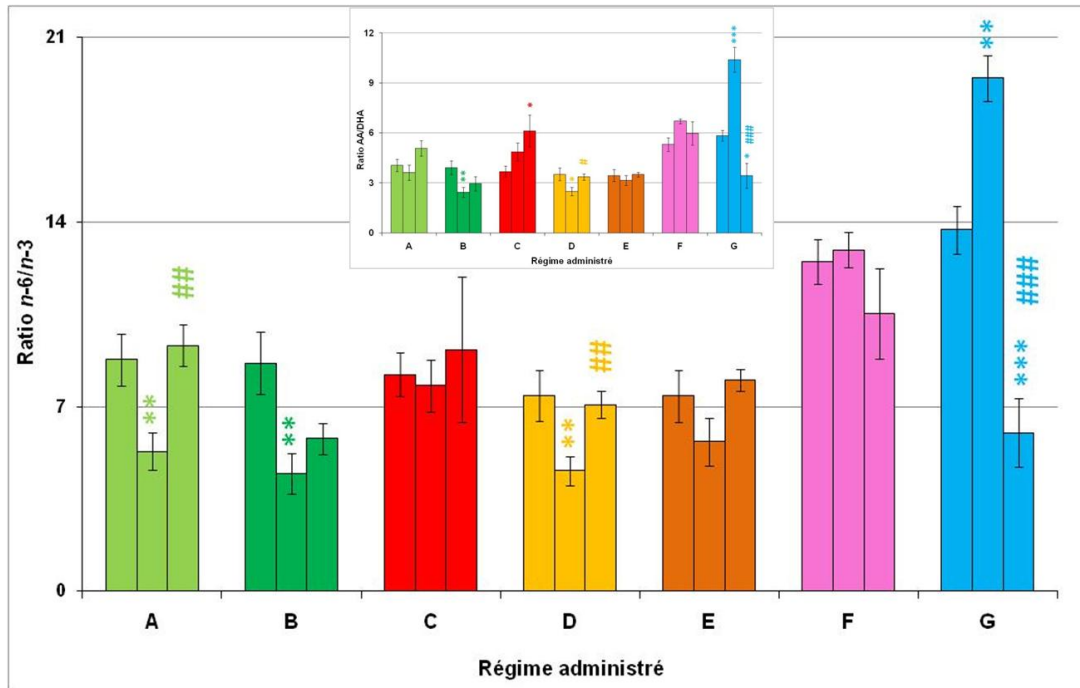


Figure 106 : Évolution du ratio des AGPI érythrocytaires

Pour chaque massif d'histogramme : T0 à gauche, semaine 12 au milieu, semaine 24 à droite
Moyenne significativement différente par rapport à T0 : * ; par rapport à la semaine 12 : #

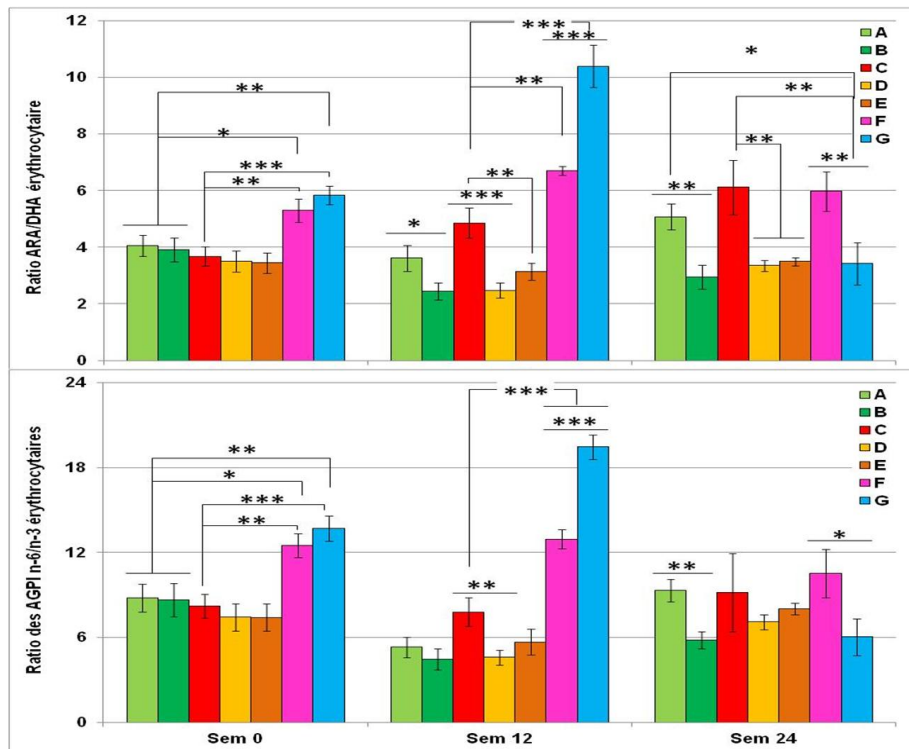


Figure 107 : Évolution des taux d'AGPI érythrocytaires selon la période

ANOVA	AGPI <i>n-6/n-3</i> érythrocytaires		Variation du ratio <i>n-6/n-3</i> érythrocytaires	
	Sem 0-24		Sem 0-24	
	F	p	F	p
Nature du régime	18,436	<0,0001	3,741	0,0024
Phase du régime	3,857	0,0234	0,486	0,4877
Nature x Phase	6,968	< 0,0001	33,256	<0,0001

Tableau 20 : Évolution des taux d'AGPI érythrocytaires (ANOVA à 2 facteurs)

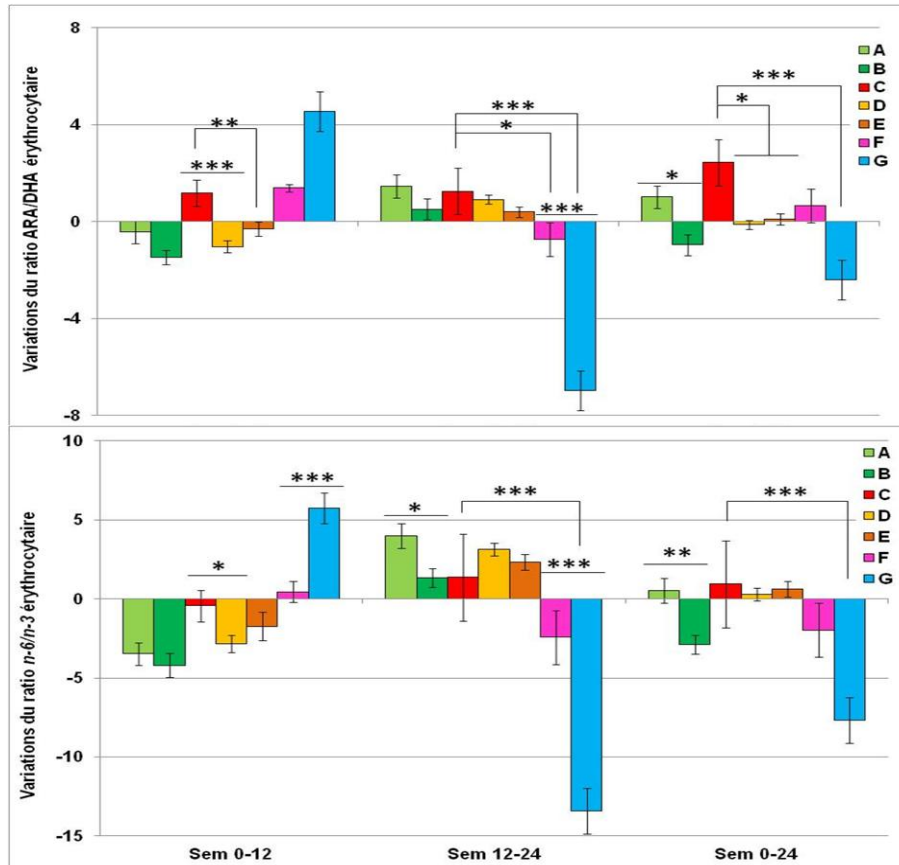


Figure 108 : Variations des taux d'AGPI érythrocytaires selon le régime et la période

Les profils érythrocytaires ARA/DHA et AGPI *n-6/n-3* montrent de grandes similitudes, confirmant la prédominance de ces deux AGPI-1c dans chaque famille d'acides gras (Figures 106 à 108). Les modifications constatées sur les AGPI en conséquence des différents régimes testés semblent avoir aussi affecté, plus modestement, les profils d'AGMI et AGS (Tableaux 21 & 22, Figures 109 & 110).

ANOVA	AGMI érythrocytaires		Variation des AGMI érythrocytaires	
	Sem 0-24		Sem 0-24	
	F	p	F	p
Nature du régime	3,656	0,0021	1,088	0,3767
Phase du régime	481,306	< 0,0001	690,358	<0,0001
Nature x Phase	2,507	0,0052	7,533	<0,0001

Tableau 21 : Évolution des taux d'AGMI érythrocytaires (ANOVA à 2 facteurs)

ANOVA	AGS érythrocytaires		Variation des AGS érythrocytaires	
	Sem 0-24		Sem 0-24	
	F	p	F	p
Nature du régime	5,147	<0,0001	2,974	0,0112
Phase du régime	22,832	< 0,0001	141,922	<0,0001
Nature x Phase	1,691	0,0747	3,02	0,0102

Tableau 22 : Évolution des taux d'AGS érythrocytaires (ANOVA à 2 facteurs)

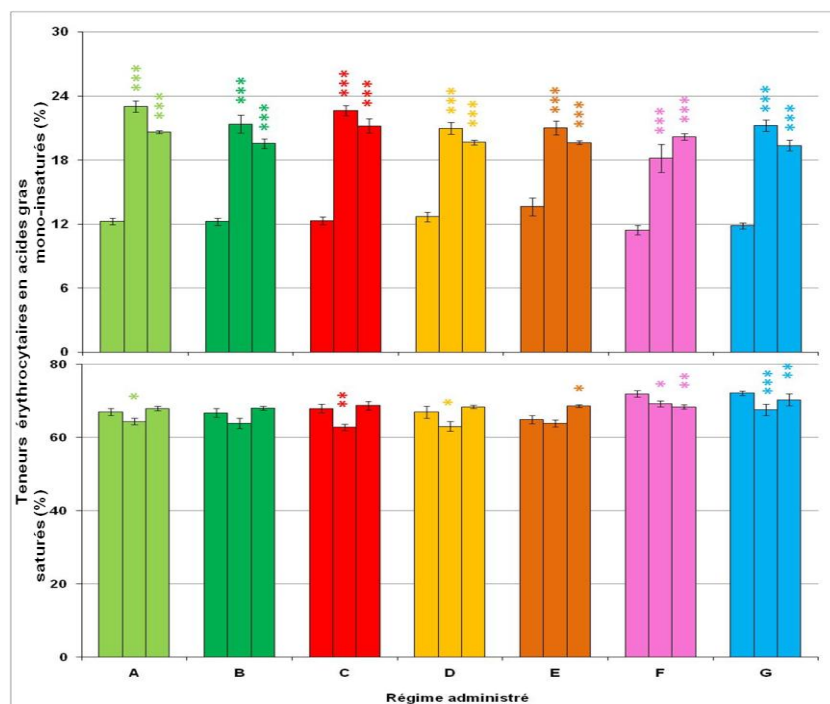


Figure 109 : Évolution des teneurs érythrocytaires en AGMI et AGS

Pour chaque massif : T0 à gauche, S12 au milieu, S24 à droite. Différence significative par rapport à T0 : *

Les profils d'AGMI montrent néanmoins des variations relativement importantes (entre 60 et 80% d'augmentation dès la période S0-S12), significativement influées par la phase, mais pas par la nature du régime (Tableau 22), ce qu'illustrent bien les Figures 109 et 110. Ces variations très marquées sont certainement liées au fait que tous les régimes testés contiennent des huiles végétales riches en AGMI (Tableau 10). Les taux d'AGS eux diminuent de manière plus modeste sur la période S0-S12 (de 3 à 7%), mais reprennent leurs niveaux à T0 au terme du programme nutritionnel, avec des variations influencées, individuellement ou en interaction, par la nature et la phase du régime.

Nous avons enfin recherché si les taux de DHA dans les érythrocytes peuvent être corrélés aux divers paramètres biologiques et métaboliques détaillés ci-dessus. Les moyennes de chacun des 7 groupes-régimes ont été prises en compte et chaque corrélation identifiée a été confirmée en considérant toutes les souris sans discernement. Aucune association avec ces taux de DHA n'a été identifiée chez les souris ayant débuté l'étude à l'âge de 9 mois, que ce soit après 12 ou 24 semaines de programme nutritionnel. Par contre, chez les souris plus jeunes (6 mois à T0), des corrélations négatives cohérentes ont été constatées après 12 semaines – mais pas 24 – de régime contrôlé entre les taux de

DHA érythrocytaires et les 3 paramètres-clés du phénotype dyslipidémique, *i.e.* les taux de masse grasse corporelle, de cholestérol et de triglycérides plasmatiques (Figure 111).

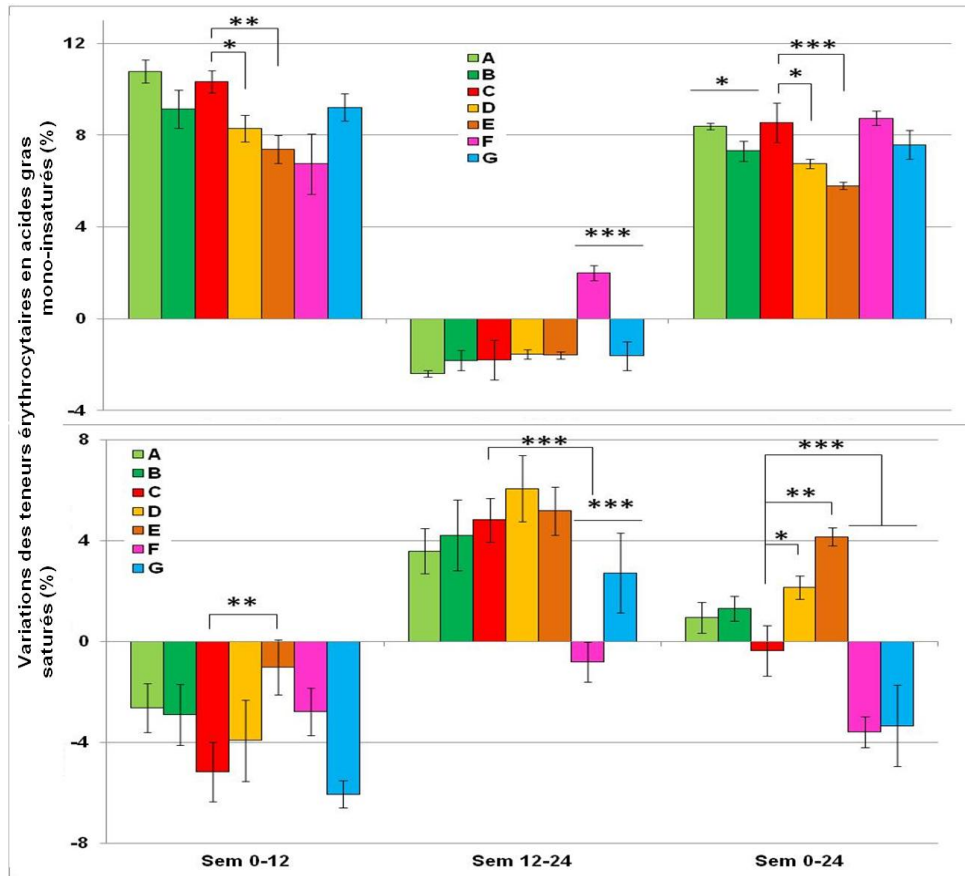


Figure 110 : Évolution des teneurs érythrocytaires en AGMI et AGS selon le régime et la période

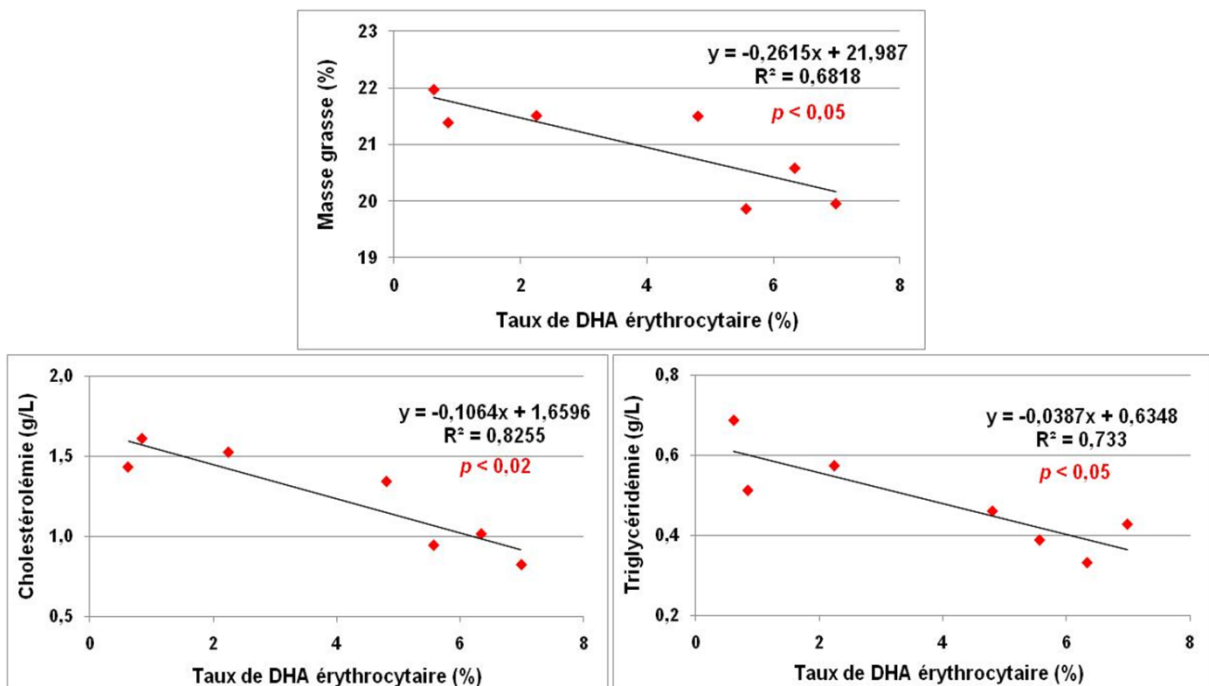


Figure 111 : Corrélations entre DHA érythrocytaire et paramètres de dyslipidémie

Ces résultats confirment que l'apport alimentaire en DHA et AGPI-*lc n-3* durant 12 semaines peut contribuer à corriger la dyslipidémie. Cet effet bénéfique, rapporté chez différents modèles animaux ou groupes de populations humaines (hyper-TG, obésité...), peut résulter de différents mécanismes induits par les AGPI-*lc n-3* ou les huiles de poisson, dont le contrôle des gènes de la lipogenèse et de la lipolyse (effets sur le cholestérol et les triglycérides : (Borthwick, 1998 ; McKenney & Sica, 2007 ; Gunnarsdottir *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2008a ; Eslick *et al.*, 2009 ; Holub, 2009 ; Zuliani *et al.*, 2009 ; Fakhrzadeh *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2010); effets sur la masse grasse : (Lombardo *et al.*, 2007 ; Noreen *et al.*, 2010 ; Sun *et al.*, 2011 ; Yepuri *et al.*, 2011)).

6. Marqueurs sanguins de processus inflammatoires et pro-oxydants

L'acquisition par certaines souris d'un phénotype dyslipidémique associé à un surpoids et à des profils érythrocytaires altérés en AGPI-*lc n-3* et *n-6* nous a incités à vérifier si des processus inflammatoires ou oxydants peuvent être induits par les régimes administrés.

Deux marqueurs d'inflammation plasmatiques ont été étudiés par ELISA, IL-6 et TNF- α . Leur dosage n'a pas permis de constater un niveau significatif d'inflammation, quel que soit l'échantillon. Les valeurs mesurées n'ont jamais été supérieures au bruit de fond, même dans les souris sous régime C. Ce résultat ne paraît guère étonnant au vu des altérations relativement modérées constatées. Nous en avons donc déduit qu'au terme de l'étude *in vivo*, aucun processus inflammatoire périphérique ne semble avoir été induit, mais nous ne pouvons pas garantir qu'il en a été ainsi durant les 26 semaines du programme nutritionnel, ces marqueurs n'ayant pu être suivis tout au long de cette étude.

Pour évaluer le statut redox, nous avons mesuré les deux formes chimiques du glutathion. Le GSH (γ -Glu-Cys-Gly) est la forme moléculaire active dans les défenses contre les processus d'oxydation cellulaire. Inversement, le GSSG résulte directement de l'oxydation du GSH après intervention dans une réaction de défense antioxydante et doit être recyclé en GSH par la glutathion réductase. C'est pourquoi le statut redox optimal implique des teneurs élevées en GSH et une proportion faible de GSSG, habituellement inférieure à 10% du glutathion total, mais dont la proportion augmente lors du stress oxydant. Les résultats obtenus sur les échantillons sanguins prélevés aussitôt après le sacrifice des souris, donc après 26 semaines de traitement, ont été comparés à ceux de souris témoins, mâles et du même âge, qui n'ont suivi aucun des régimes de l'étude. Ces souris, en provenance du même élevage, ont été introduites dans l'animalerie quatre semaines avant leur sacrifice et alimentées sous régime standard Harlan 2018S.

Les souris des différents groupes-régimes présentaient une concentration moyenne de GSH sanguin, principalement d'origine érythrocytaire, voisine de 0,6 mM, environ 20% plus faible que les souris standard (Figure 112). Les souris sous régime B possédaient des teneurs en GSH significativement plus élevées ($p < 0,01$) que celles sous régime A, avec un taux de GSSG de 7% bien inférieur à celui des souris A ou standard. De même, les souris des groupes F et G présentent des niveaux similaires de GSH, mais les

souris G présentent un taux de GSSG diminué de moitié ($p < 0,01$). Ces résultats suggèrent que les AGPI-*lc n-3* puissent apporter un bénéfice en termes de capacités antioxydantes lors d'un régime normocalorique. Il faut aussi noter que le régime A, que nous avons considéré comme le régime témoin de notre étude, s'est avéré moins neutre que prévu, induisant une baisse moyenne de 30% du GSH accompagnée d'une augmentation ($p = 0,17$) du taux de GSSG, visible aussi chez les souris du groupe F. Cette situation traduit une altération non négligeable du statut redox par les ingrédients du régime A et que les AGPI-*lc n-3* du régime B ont pu empêcher. À l'inverse, ces AGPI ne semblent pas en mesure d'améliorer les conditions pro-oxydantes, même limitées (environ 15%, $p = 0,3$ en moyenne), induites par les régimes hypercaloriques. Enfin, contrairement à ce que nous pouvions attendre, le statut redox sanguin des souris sous régime E n'a pas été notablement modifié par rapport aux souris sous les autres régimes hypercaloriques, ce qui semble indiquer que dans le régime E, les composés présents dans l'huile d'olive vierge extra, les polyphénols en particulier, n'offrent aucune protection antioxydante particulière.

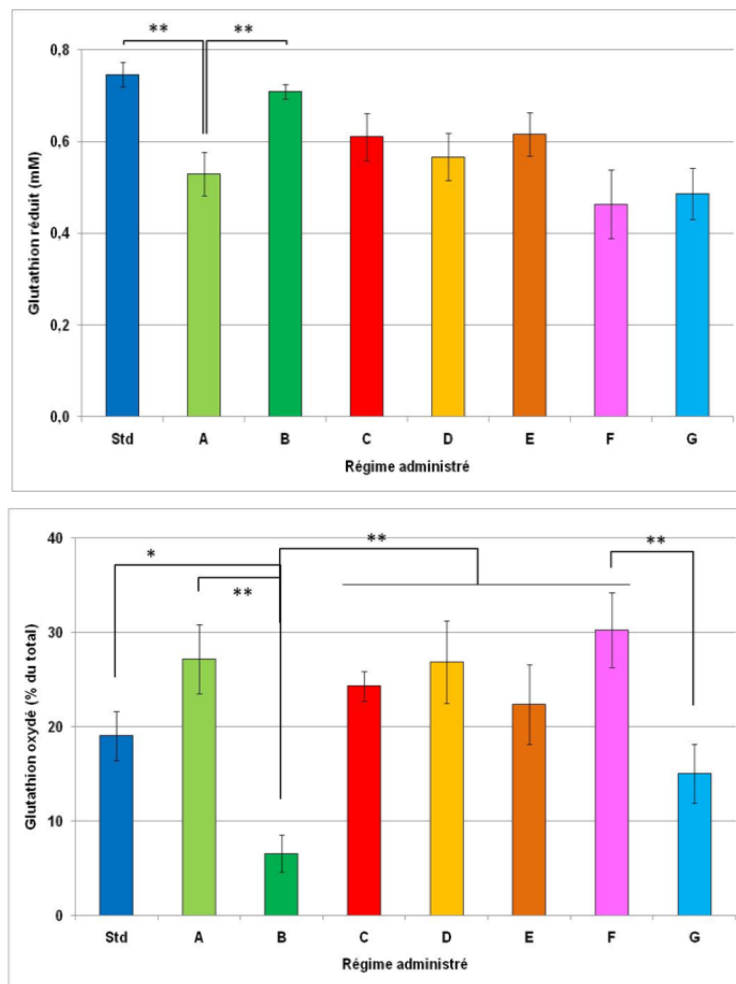


Figure 112 : Étude du glutathion sanguin au terme du programme nutritionnel

En haut, la concentration érythrocytaire de GSH (mM) ; en bas, la proportion de GSSG (% du glutathion total)

Nous avons donc recherché s'il existe une corrélation entre les taux de glutathion mesurés à 26 semaines et les autres résultats biologiques et métaboliques obtenus en fin de programme nutritionnel. En

comparant les valeurs moyennes pour chaque groupe-régime, aucune association significative n'a été identifiée entre tous ces paramètres, à l'exception des corrélations entre le taux de GSSG, marqueur de stress oxydant, et les taux des AGPI *n-3* (mais pas les AGPI *n-6*, $p = 0,79$) dans les érythrocytes (Figure 113).

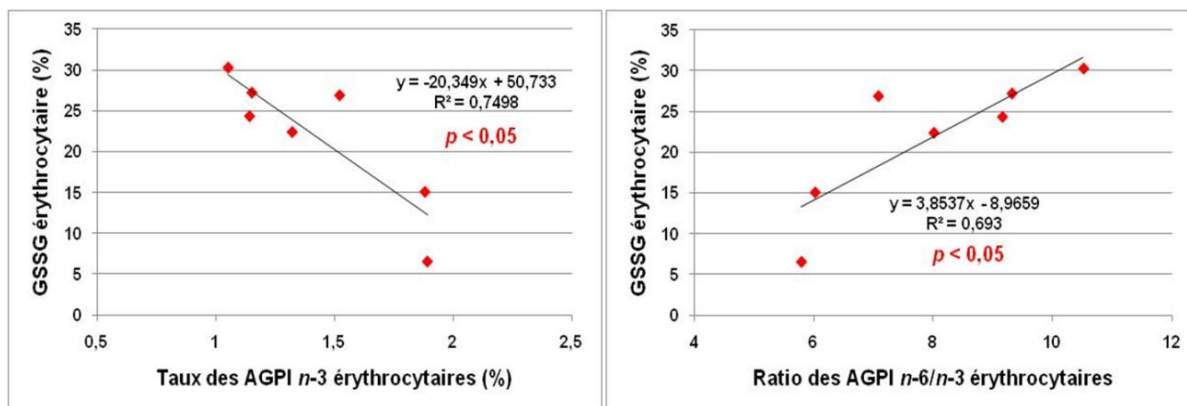


Figure 113 : Influence des AGPI sur le statut redox érythrocytaire

De façon intéressante, les corrélations mises en évidence convergent vers l'idée que les AGPI *n-3* sont associés à une moindre production érythrocytaire de GSSG, donc à la préservation du glutathion sous sa forme GSH antioxydante active. Ceci est en accord avec l'hypothèse formulée lors de l'analyse des résultats de la Figure 112, suggérant que l'enrichissement en AGPI *n-3* des membranes érythrocytaires en conséquence de la supplémentation nutritionnelle par l'huile de poisson puisse limiter les processus pro-oxydants ou leurs effets. En raison de leur degré élevé d'insaturation, les AGPI sont des molécules particulièrement sensibles à l'oxydation lipidique, ce qui complique leur manipulation et leur utilisation, y compris dans les matrices alimentaires (Lu *et al.*, 2011). Bien que les AGPI-*lc n-3*, en particulier le DHA, soient capables d'influer sur le statut redox notamment en régulant l'expression des enzymes antioxydantes, leurs propriétés réelles vis-à-vis du stress oxydant sont très controversées dans la littérature. Certaines études ont observé un effet bénéfique similaire à celui que nous avons constaté, chez l'homme (Siener *et al.*, 2010) comme *in vitro* (Arab *et al.*, 2006 ; Brand *et al.*, 2008). D'autres rapportent au contraire que leur consommation alimentaire favorise l'apparition d'un stress oxydant périphérique ou même central (Gorjão *et al.*, 2006 ; Vibet *et al.*, 2008 ; Park *et al.*, 2009 ; Filaire *et al.*, 2010 ; Carrepeiro *et al.*, 2011) ainsi que dans divers types cellulaires *in vitro* (Leonardi *et al.*, 2005 ; Merendino *et al.*, 2005 ; Shimazawa *et al.*, 2009 ; Shoji *et al.*, 2009). Il est impossible d'écarter enfin le fait que l'accrétion des AGPI-*lc n-3* dans les phospholipides membranaires peut aussi résulter en un remodelage fin de la bicouche, avec pour conséquence possible la relocalisation des protéines membranaires et/ou la modulation de leur activité. Cette réorganisation structurale et fonctionnelle peut aussi concerner des protéines comme la γ -glutamyl transférase, enzyme membranaire externe déterminante pour l'apport exogène de la cystéine du GSH, ou des complexes d'oxydoréductases activés avec l'âge, afin de préserver le statut redox, en particulier au niveau érythrocytaire, et limiter la peroxydation lipidique lors du vieillissement (Hyun *et al.*, 2006).

7. Comportement et cognition

Tout au long du programme nutritionnel de l'étude, les souris ont été suivies sur le plan comportemental, afin d'identifier d'éventuelles attitudes ou réactions particulières qui pourraient être associées à un régime spécifique. Ce suivi a permis de vérifier l'absence de telles modifications comportementales, en particulier celles pouvant affecter la sociabilité, la mobilité ou l'exploration.

Cette étude avait parmi ses objectifs principaux celui d'évaluer la sensibilité des capacités mnésiques des souris aux différents régimes conçus lors du vieillissement physiologique et dans des conditions pathologiques induites par un stress amyloïde. Le premier aspect a consisté à suivre l'évolution des fonctions cognitives au cours du programme nutritionnel et à définir si les conditions métaboliques résultant des régimes administrés avaient des répercussions sur la cognition. Les souris ont été régulièrement soumises à un test permettant d'évaluer, dans un dispositif en Y (« *Y-maze* »), la mémoire spatiale ou à court terme. Ce test repose sur la curiosité et le comportement exploratoire spontané des animaux. Il a été choisi pour son caractère non contraignant, ne devant *a priori* laisser aucune trace mnésique et de ce fait se prêtant plutôt bien au suivi et à la répétition du test toutes les 6 semaines. Mais nous devons admettre qu'en raison de son caractère non aversif pour la souris, la réussite de ce test repose sur la disposition de l'animal à collaborer en explorant les branches du Y. Or, c'est précisément ce que les souris ont consenti à faire de plus en plus difficilement au fur et à mesure des répétitions. La baisse de la motivation des souris a été évaluée et analysée, mais semble affecter sensiblement tous les groupes-régimes sans différence fondamentale dans leur évolution avec l'avancée du programme, à l'exception des souris F et G soumises à des régimes conçus selon un schéma particulier (Figure 114). Ces observations nous ont conduits à considérer que les résultats obtenus ensuite sont parfaitement exploitables et dignes d'intérêt.

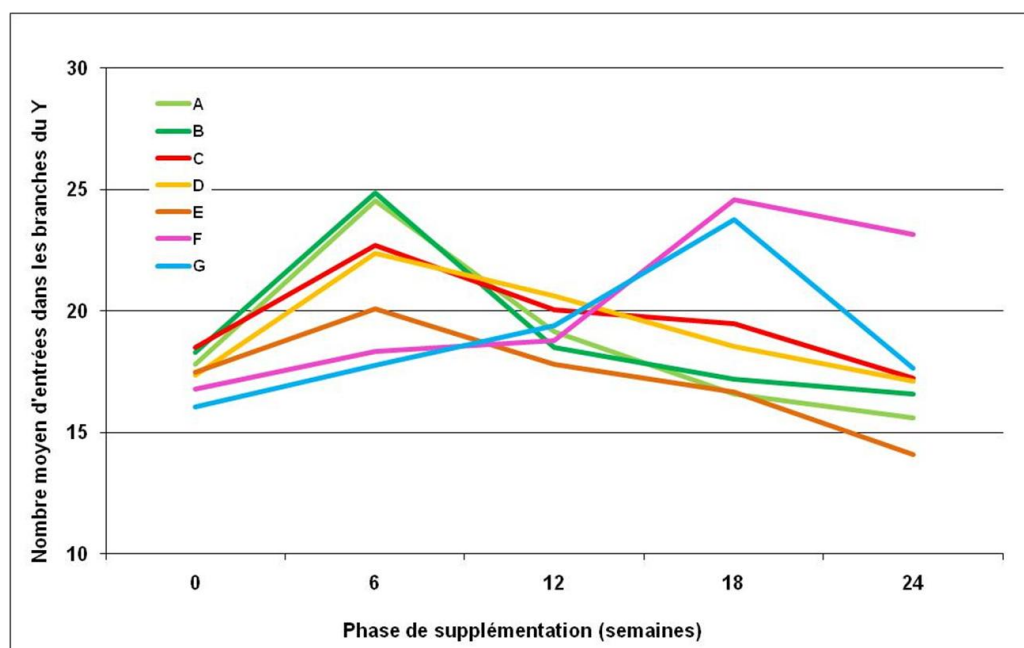


Figure 114 : Évolution de la motivation des souris au long des répétitions du test du Y

Nous avons donc suivi les taux d'alternance spontanée qui représentent l'exploration successive des trois branches du Y. Ces taux traduisent la capacité d'une souris quittant une branche du Y à se souvenir de la branche déjà visitée pour aller explorer la dernière. La représentation graphique des résultats a été simplifiée en n'incluant dans les figures ci-après que les taux d'alternance mesurés à T0 et aux semaines 12 et 24. L'analyse ANOVA à deux variables a montré que les taux d'alternance spontanée, proportionnels donc aux capacités de mémoire spatiale ou à court terme, sont indexés seulement sur la nature du régime, mais pas sur, ni en interaction avec, la phase (Tableau 23). Les variations des capacités sur ce test traduisent la même influence par la nature seule du régime, mais sa significativité est en revanche limitée.

ANOVA	Alternance spontanée (%)		Variations de l'alternance	
	Sem 0-24		Sem 0-24	
	F	p	F	p
Nature du régime	5,828	< 0,0001	2,215	0,0553
Phase du régime	2,121	0,1215	0,095	0,7587
Nature x Phase	1,034	0,4165	0,675	0,6427

Tableau 23 : Évolution de la mémoire spatiale des souris âgées de 9 à 15 mois (ANOVA à 2 facteurs)

L'influence du régime nous a conduits à constater d'emblée que les souris présentant les taux d'alternance spontanée les plus élevés, et donc la meilleure mémoire à court terme, appartiennent aux groupes B, D et E. À l'inverse, les souris présentant les taux d'alternance les plus faibles et donc les moins bonnes capacités mnésiques sont celles sous régime C. C'est aussi le cas des souris F et G qui, tout en ayant démarré l'étude avec des capacités mnésiques inexplicablement inférieures ($p < 0,05$) aux souris des autres groupes (Figures 115 & 116), diminuent encore leurs performances de façon similaire aux souris C après 12 semaines, puis les améliorent très logiquement de S12 à S24. Les tendances observées sont valables aussi bien pour les souris suivies entre l'âge de 9 et 15 mois que pour celles entre 6 et 12 mois, même si l'on peut globalement constater que les taux d'alternance sont légèrement supérieurs chez les souris plus jeunes.

Après 12 semaines des régimes testés, seules les souris supplémentées en huile de poisson ont réussi à maintenir leurs performances mnésiques initiales, les variations interindividuelles nous empêchant d'évoquer une amélioration (Figure 117). À l'inverse, les souris sous régime A ou C les ont diminuées, en particulier celles du groupe C qui sont les seules à accuser une variation significative entre T0 et S12, ceci en raison à la fois de différences interindividuelles relativement importantes et de variations modestes. Mais conformément à nos hypothèses initiales, la supplémentation en AGPI-1c *n*-3 conduit donc bien à préserver la mémoire à court terme comparativement aux groupes homologues témoins A et C, et ceci très significativement ($p < 0,001$) sous régimes hyperlipidiques. Nos résultats soulignent aussi avec force l'idée selon laquelle les modifications métaboliques induites en conséquence du régime hyperlipidique C ont un impact négatif sur la cognition.

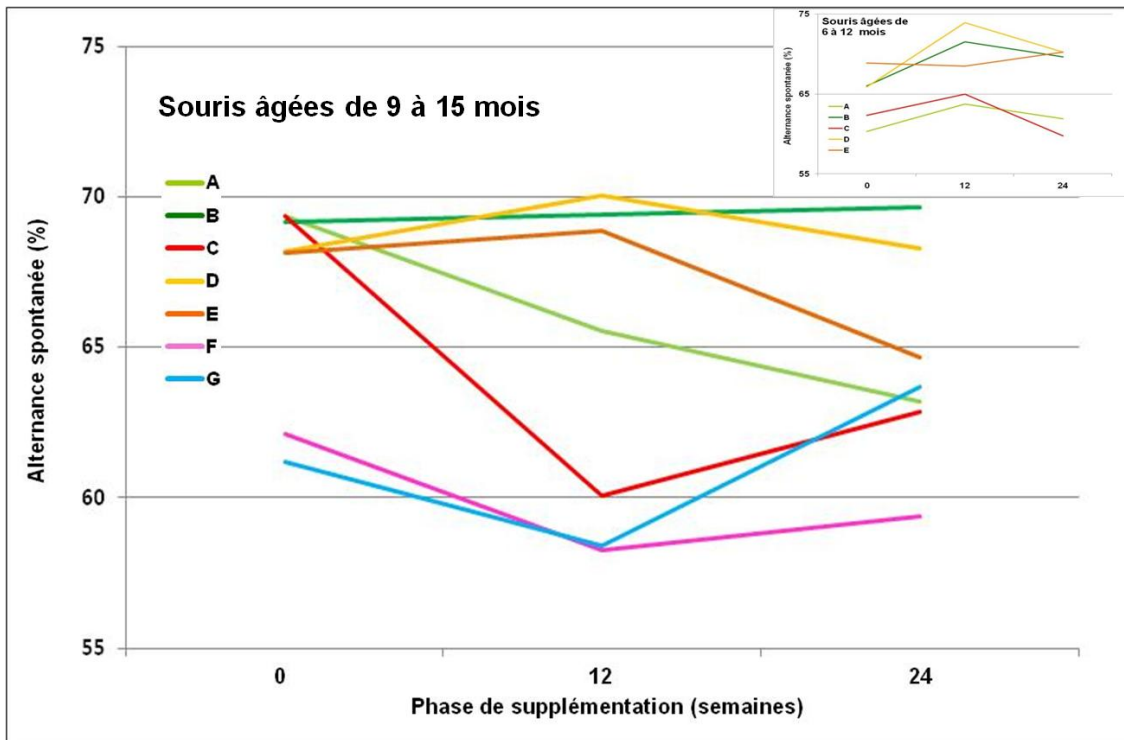


Figure 115 : Évolution de la mémoire spatiale durant le programme nutritionnel
Graphique principal : souris âgées de 9 à 15 mois ; graphique en insert : souris âgées de 6 à 12 mois

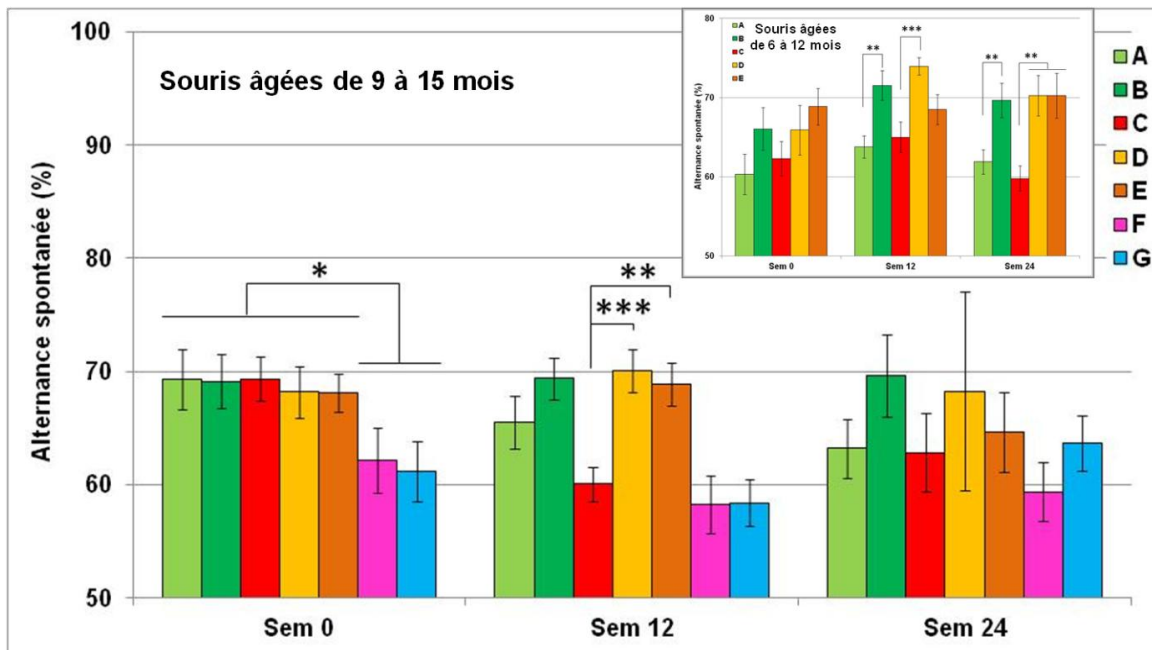


Figure 116 : Évolution de la mémoire spatiale selon la période

Les régimes ont montré des effets semblables chez les souris âgées de 6 à 12 mois, mais avec des différences qu'il faut commenter. La première concerne les niveaux de performance à T0, inférieurs à ceux des souris de la série 9-15 mois comme des souris habituellement accueillies au laboratoire. Il est

difficile d'expliquer rationnellement cette observation, mais il faut intégrer que les résultats à ce test d'exploration sont largement basés sur « le plein gré » des animaux et donc dépendants de leur niveau d'anxiété, même si aucune particularité comportementale ne nous a alertés lors de la période d'acclimatation préalable au programme nutritionnel. La deuxième différence, sans doute liée à la première, réside au niveau de l'augmentation des performances, en moyenne plus importante, sur la période S0-12. Pourtant, les souris de cette série « jeune » ont atteint finalement des performances voisines à la 24^e semaine, mais selon une cinétique apparemment distincte de la série « âgée » (Figures 116 & 117), sous l'influence individuelle de la nature et cette fois de la phase du régime (Tableau 24).

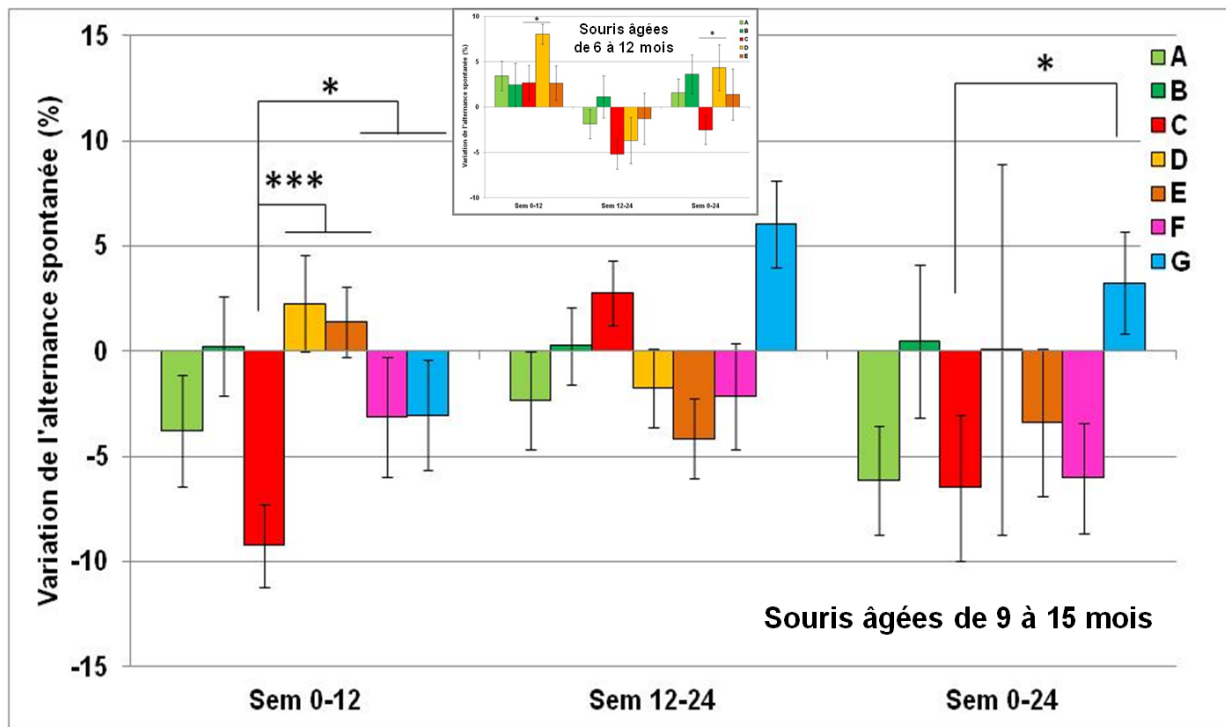


Figure 117 : Évolution de la mémoire spatiale durant le programme nutritionnel
Graphique principal : souris âgées de 9 à 15 mois ; graphique en insert : souris âgées de 6 à 12 mois

ANOVA	Alternance spontanée (%)		Variations de l'alternance	
	Sem 0-24		Sem 0-24	
	F	p	F	p
Nature du régime	9,53	< 0,0001	1,581	0,1824
Phase du régime	3,566	0,0296	0,004	0,9488
Nature x Phase	0,595	0,7820	0,517	0,7233

Tableau 24 : Évolution de la mémoire spatiale des souris âgées de 6 à 12 mois (ANOVA à 2 facteurs)

Focalisons à présent l'analyse sur les 12 premières semaines du programme nutritionnel. Même si la mémoire spatiale des souris des groupes B, D et E (et G) est restée supérieure jusqu'au terme de l'étude, cette observation est surtout vraie durant cette première phase (Figure 118), lors de laquelle les régimes D et E ont favorisé le maintien des performances mnésiques en conditions de régime

hypercalorique ($p < 0,001$ et $p < 0,01$, respectivement, Figures 116 & 117). De façon intéressante aussi, les composés présents dans l'huile d'olive vierge extra, soupçonnés à maintes reprises de contrarier les effets bénéfiques des AGPI- $n-3$ sur plusieurs des paramètres analysés précédemment, semblent n'avoir eu aucun impact sur la mémoire à court terme, puisqu'ils n'ont ni annihilé, ni amélioré les capacités des AGPI- $n-3$ de prévenir le déclin cognitif, au moins jusqu'à la 12^e semaine.

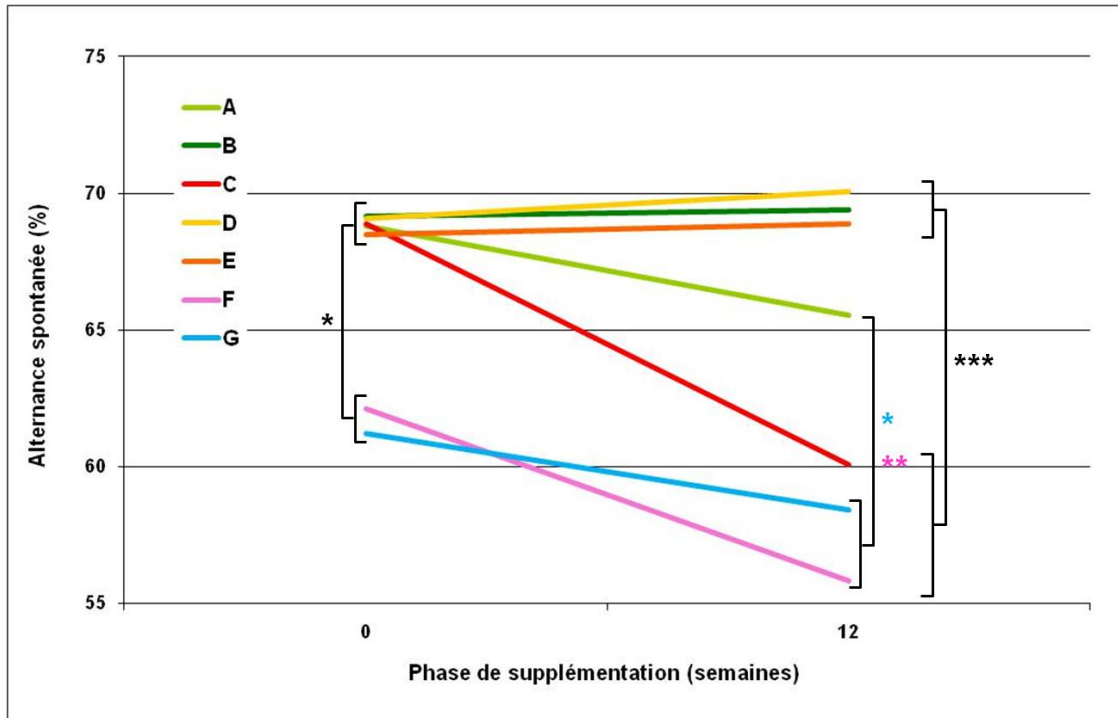


Figure 118 : Influence des régimes sur la mémoire spatiale après 12 semaines

Par ailleurs, les capacités mnésiques des souris sous régime A tendent à diminuer tout au long de l'étude de façon rectiligne, ce qui n'a pas été observé pour les souris plus jeunes. Ceci suggère peut-être un effet propre des ingrédients de ce régime A, comme nous l'avons supposé à propos du statut redox sanguin, contribuant à accélérer un déclin cognitif, peut-être lié au vieillissement, ce que les AGPI- $n-3$ semblent avoir pu prévenir. Enfin, bien que démarrant l'étude à un taux anormalement plus faible et évoluant de façon très discontinue, la mémoire à court terme des souris F et (surtout) G s'améliore après leur passage sous régime normocalorique, mais ceci ne semble guère déterminant à en juger par le profil des souris C entre les semaines 12 et 24. Quoiqu'il en soit, les souris G ont terminé l'étude avec leurs capacités initiales et de meilleures performances que les souris F non supplémentées en AGPI- $n-3$.

À ce stade, nous avons mené une analyse statistique afin d'identifier les paramètres dont les variations pouvaient être liées à celles des capacités de mémoire à court terme. L'analyse a débuté en intégrant les moyennes de chacun des 7 groupes-régimes, avant de confirmer chaque corrélation identifiée en prenant en compte toutes les souris correspondantes sans discernement. Le premier paramètre analysé pour ses capacités à influencer sur les performances mnésiques des souris a été la composition en AGPI dans les membranes érythrocytaires.

Après 12 semaines sous régime contrôlé, les souris présentent des performances de mémoire spatiale qui sont positivement et significativement corrélées aux taux de DHA et des AGPI *n-3* érythrocytaires, alors qu'elles sont négativement liées aux ratios ARA/DHA ou *n-6/n-3* (Figure 119). Par contre, ces associations ont toutes disparu au terme du programme nutritionnel, possible conséquence des changements supposés intervenus après la 12^e semaine. L'âge des souris ne semble pas devoir expliquer ces résultats. En effet, aucune différence significative n'a été constatée à T0 entre les performances de mémoire spatiale des souris âgées de 6 ou de 9 mois, tout comme à la 12^e semaine. De plus, les corrélations illustrées par la Figure 119 ont été identifiées à l'identique chez les souris des deux groupes d'âge, mais seulement après 12 semaines, car de même, elles n'ont été retrouvées à la fin de l'étude *in vivo* chez aucun des deux groupes d'âge des souris.

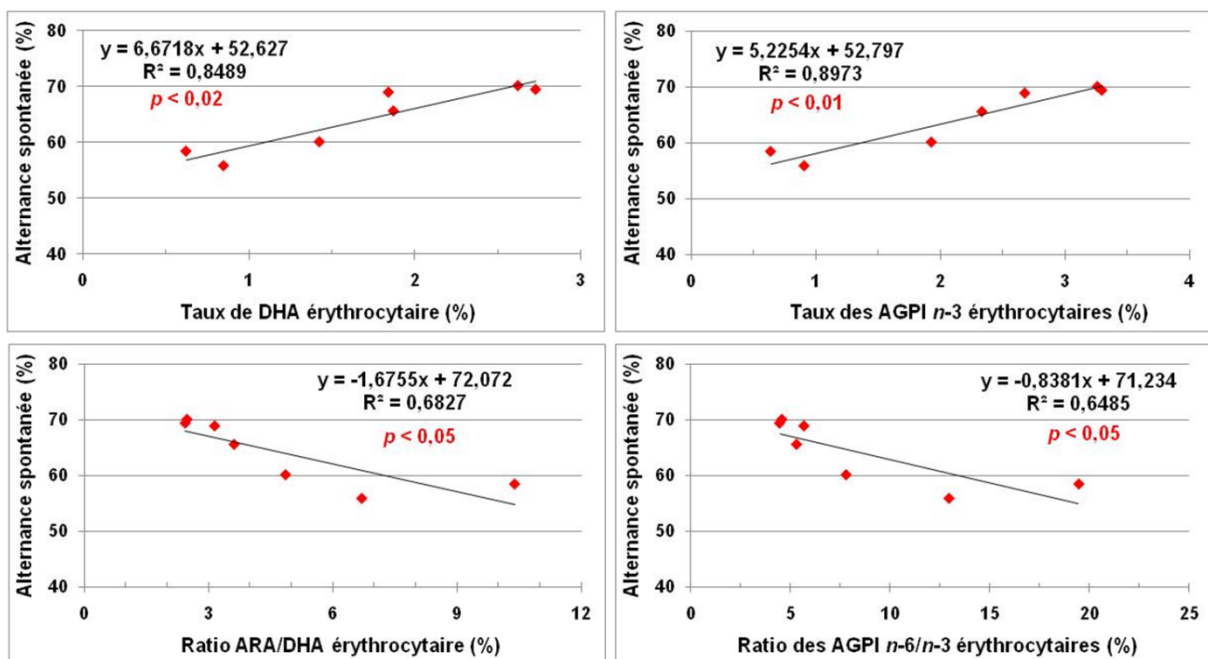


Figure 119 : Influence des taux d'AGPI sur la mémoire spatiale après 12 semaines

Notons enfin que chez les plus jeunes seulement, nous avons également identifié une corrélation négative ($R^2 = 0,665$; $p < 0,05$) entre les taux d'AGS dans les érythrocytes des souris et les capacités mnésiques, mais cette corrélation s'est avérée non significative ($p = 0,115$) chez les souris plus âgées. En règle générale, il faut d'ailleurs noter que très peu de différences ont été observées entre les résultats des souris des deux groupes d'âge soumises à un même régime. Il est donc très probable que la mise en évidence d'une corrélation significative dans un groupe d'âge ou un autre reflète davantage un problème de dispersion des valeurs et de variance plutôt qu'une réponse distincte ou inverse liée à l'âge des souris. Enfin, précisons qu'aucun paramètre biologique ou métabolique n'a été corrélé significativement avec la mémoire à court terme des souris testées, quel que soit leur âge.

Cette même étude de corrélation a été réalisée non plus sur la base des moyennes des groupes, mais à l'aide d'un test apparié de Spearman intégrant les valeurs individuelles de toutes les souris

(Figure 120). Les corrélations identifiées par cette analyse renforcent les résultats précédents qui, considérés dans leur ensemble, indiquent que les régimes testés dans le cadre de cette étude conduisent à des variations biologiques et métaboliques corrélées entre elles et avec l'évolution des capacités mnésiques des souris, au moins après 12 semaines du programme nutritionnel. La supplémentation alimentaire en AGPI-*n*-3 paraît donc en mesure de prévenir ou limiter les effets délétères d'un régime hyperlipidique chargé en cholestérol sur la masse corporelle, la masse grasse, la dyslipidémie, les taux sanguins de cholestérol et de triglycérides, ainsi que sur la mémoire à court terme, paramètre visiblement corrélé aux précédents. La supplémentation en huile d'olive vierge extra associée aux AGPI-*n*-3 de l'huile de poisson n'a montré aucun effet synergique, mais a plutôt semblé inhiber les bénéfices apportés par ces AGPI, à l'exception notable toutefois de ceux sur la mémoire, suggérant donc l'implication de mécanismes distincts.

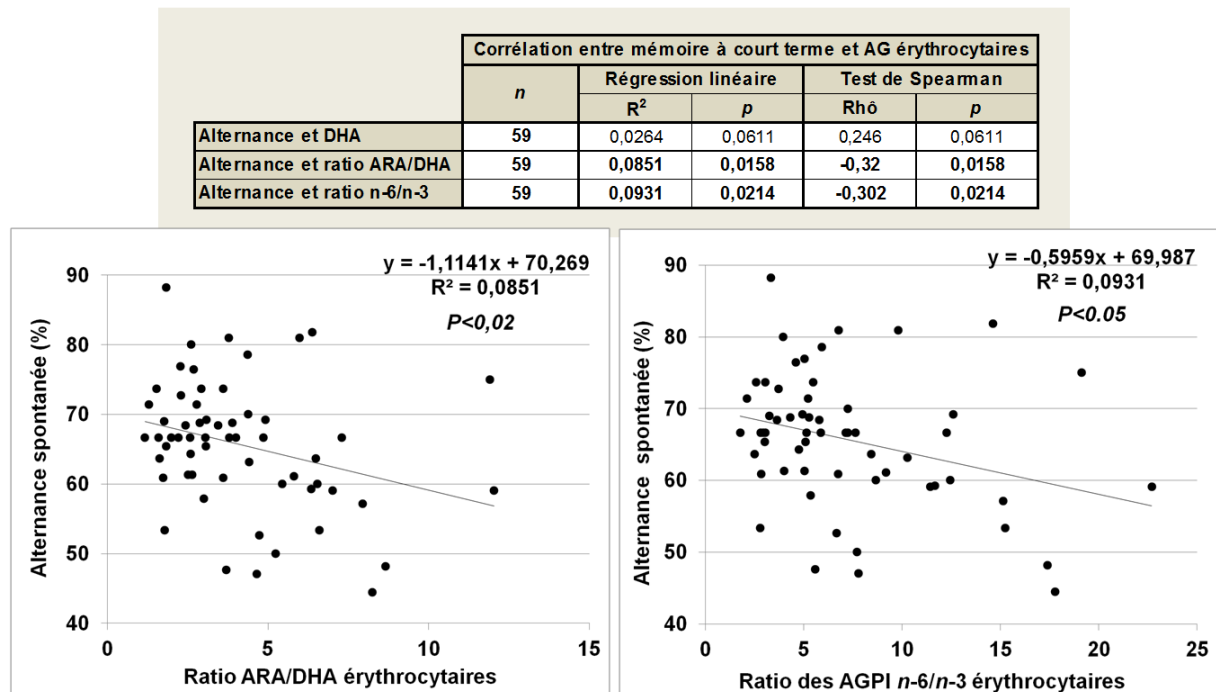


Figure 120 : Influence des taux d'AGPI sur la mémoire spatiale après 12 semaines

8. Stress amyloïde et capacités cognitives

L'étude prévoyait qu'après le programme nutritionnel de 24 semaines, chaque groupe-régime soit scindé en deux sous-groupes de souris appelées à subir, sous anesthésie et à l'aide d'un dispositif de stéréotaxie, une injection unique dans le ventricule latéral droit du cerveau d'une solution d'AβOS en concentration subnanomolaire ou de la solution saline véhicule. Pour garantir l'homogénéité des sous-groupes et favoriser l'interprétation des résultats expérimentaux, les souris de chaque groupe-régime ont été réparties de façon dirigée et non aléatoire. L'objectif était donc clairement que les deux sous-groupes apparentés soient constitués afin de présenter des niveaux de performances mnésiques comparables sur la base des moyennes des résultats du test de la mémoire à court terme réalisé la 24^e semaine, c'est-à-

dire la semaine juste avant l'injection. L'impact du stress amyloïde induit par les A β O est évalué comparativement entre les souris des différents sous-groupes et groupes-régimes selon un scénario validé, illustré par la Figure 58, permettant l'investigation par ordre chronologique de la mémoire à court terme, puis des capacités d'apprentissage et enfin de la mémoire à long terme.

Pour des raisons inexplicables, nous avons dû constater que les oligomères A β injectés n'ont pas produit les effets délétères attendus sur les souris, quel que soit le groupe-régime d'origine. La faisabilité et la pertinence de ce type d'expérimentation sur des souris de cet âge (15 mois au moment de l'injection) avaient bien sûr été démontrées au préalable. De même, les oligomères avaient passé avec succès les tests habituels évaluant leur neurotoxicité *in vitro* et *in vivo* et s'étaient avérés de bonne qualité, tout à fait utilisables. Nous avons d'ailleurs pu le confirmer notamment par les résultats, parfaitement exploitables cette fois, obtenus sur le lot des souris plus jeunes, âgées de 12 mois à l'injection. Les opérations sur chacun des lots ont évidemment été menées selon les mêmes procédures, avec le même dispositif expérimental et par le même manipulateur « chirurgien » expérimenté.

Comme indiqué plus haut, nous avons réalisé deux études similaires sur des souris de 9-15 mois ou plus jeunes, âgées de 6-12 mois. Si l'injection des A β O n'a donné aucun signe de stress amyloïde sur les souris plus âgées témoins non supplémentées et donc théoriquement sensibles à l'exposition aux oligomères, elle a revanche conduit aux effets attendus sur la série des souris plus jeunes étudiée avec trois mois de décalage dans le temps. Même si nous pensons pouvoir écarter toute influence des souris elles-mêmes sur cette différence, nous ne pouvons pas en donner d'explication *a posteriori*. Nous ne donnerons donc ci-après que les résultats obtenus avec la série des souris plus jeunes, âgées donc de 12 mois au lieu de 15 au moment de l'exposition au peptide amyloïde. Comme nous l'avons indiqué ci-dessus, les deux « générations » de souris testées ont répondu aux régimes alimentaires administrés de façon très comparable en regard des paramètres biologiques, métaboliques ou cognitifs testés, les souris plus âgées n'ayant montré une sensibilité ni accrue ni moindre aux régimes administrés. Évidemment, les corrélations des performances cognitives post-injection avec les paramètres biologiques ou métaboliques ne seront recherchées en n'analysant que les résultats obtenus sur ce lot de souris.

a. Mémoire à court terme

Le premier paramètre cognitif évalué quatre jours après l'injection intracérébroventriculaire a donc été la mémoire à court terme (ou spatiale). Pour chaque régime, les performances des souris ayant subi l'injection d'oligomères A β et le stress amyloïde en conséquence ont été comparées à celles des souris n'ayant subi que l'injection de la solution saline véhicule, dont l'absence d'effet a déjà été vérifiée sur la cognition et sur les protéines synaptiques dont le profil est normalement altéré en réponse au stress amyloïde. Plusieurs différences ont été notées entre les groupes-régimes, suggérant une susceptibilité distincte au stress amyloïde. L'analyse ANOVA à deux facteurs réalisée sur ces résultats a permis de montrer que l'alternance spontanée varie seulement en fonction de la nature du régime, alors que le

traitement (injection d'oligomères A β solubles ou de solution saline) ne semble pas influencer sur les performances de mémoire à court terme, certainement en raison du fait que certains régimes ont réussi à annihiler le stress amyloïde et ses conséquences sur le plan cognitif (Tableau 25).

ANOVA	Alternance spontanée	
	F	p
Nature du régime	2,285	0,0403
Traitement	1,558	0,2144
Nature x Traitement	1,873	0,0913

Tableau 25 : Effets du stress amyloïde sur la mémoire spatiale des souris (ANOVA à 2 facteurs)

Le premier constat évident à l'analyse des résultats obtenus concerne le fait que les souris des groupes B, D, E et G ayant bénéficié d'un régime alimentaire enrichi avec l'huile de poisson présentent des capacités de mémoire à court terme inchangées après exposition aux oligomères A β solubles (Figure 121). Il faut noter le profil particulier des souris du groupe E dont les capacités moyennes semblent supérieures, les plus élevées même, dans le sous-groupe traité par le peptide A β comparativement au sous-groupe témoin, ce qui semble difficile à expliquer. Ces résultats confirment néanmoins que la supplémentation nutritionnelle en AGPI-*lc n-3* contribue à préserver les capacités mnésiques en augmentant la résistance des neurones au stress amyloïde. À l'inverse, les souris des groupes A, C et F n'ayant bénéficié d'aucun apport détectable en AGPI-*lc n-3* présentent une baisse significative ($p < 0,05$) de leurs performances dans le dispositif en Y. Ceci confirme la neurotoxicité des oligomères A β par leur capacité à induire les déficits cognitifs attendus.

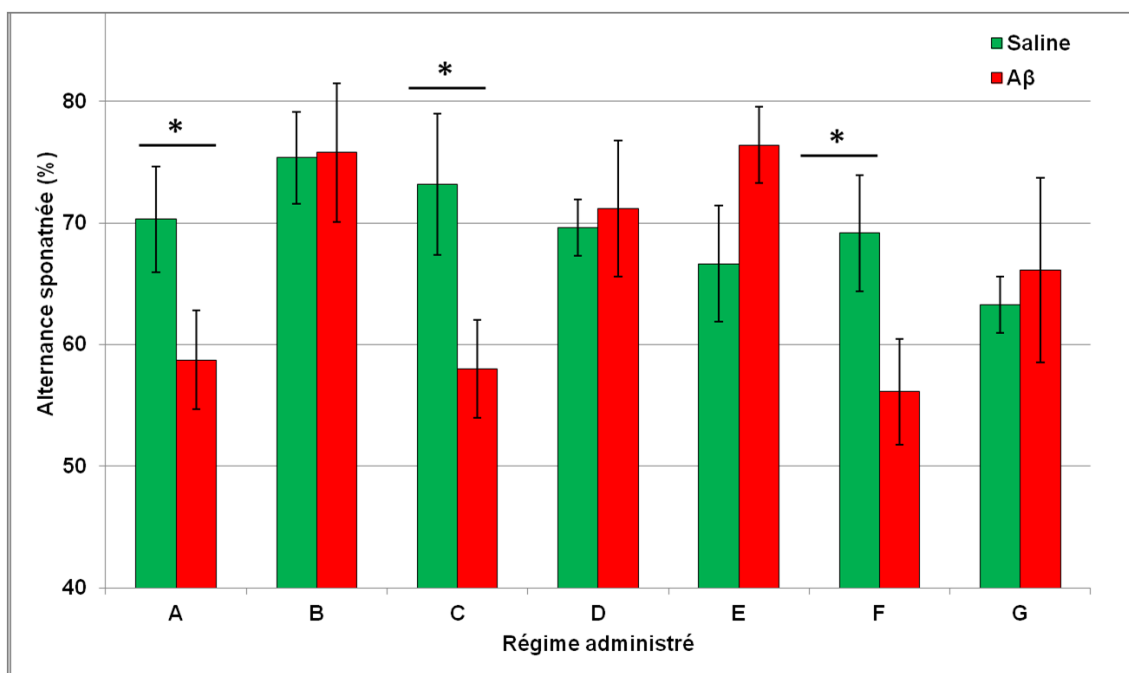


Figure 121 : Influence des régimes sur la mémoire spatiale après injection

La comparaison des capacités moyennes de mémoire à court terme entre les groupes-régimes donne des résultats distincts selon qu'il s'agit des souris témoins ayant subi l'injection de la solution saline véhicule ou des souris traitées exposées au stress amyloïde après injection des oligomères A β (Figures 122 & 123). En effet, les souris témoins montrent des capacités qui ne diffèrent pas significativement entre les groupes-régimes, même si les souris du groupe B ont montré les meilleurs taux moyens d'alternance, mais avec une variabilité interindividuelle relativement élevée comme dans tous les groupes. Par contre, des différences nettes liées aux régimes ont été relevées entre les souris traitées par le peptide A β . Comme l'illustre la figure 121, les souris dont la mémoire spatiale est la plus faible sont celles n'ayant pas consommé d'huile de poisson, c'est-à-dire celles des groupes A, C et F, en notant aussi que le régime hyperlipidique C administré durant 6 mois ne semble pas sensibiliser davantage les souris au stress amyloïde que le régime normolipidique A. En revanche, les souris des groupes B, D et E, qui ont bénéficié d'une supplémentation en AGPI-*lc n-3*, montrent des taux d'alternance significativement plus élevés que celles soumises aux régimes homologues témoins A et C.

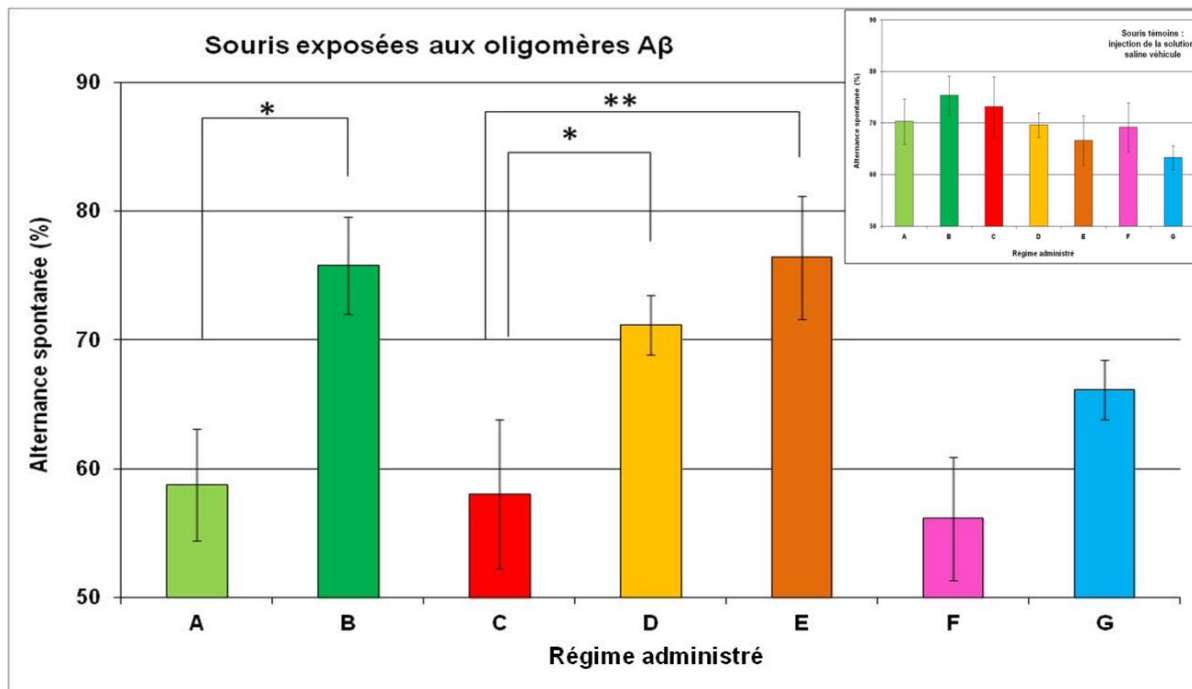


Figure 122 : Influence des régimes sur la sensibilité au stress amyloïde (mémoire spatiale)
Graphique principal : après injection des oligomères A β ; insert : après injection de la solution saline

Ces résultats démontrent clairement les bénéfices de la supplémentation en AGPI-*lc n-3* sur la mémoire, dans les conditions physiologiques comme et surtout lors du vieillissement pathologique modélisé par l'exposition aux oligomères A β . La neuroprotection constatée bénéficie aussi aux souris G auxquelles, ainsi qu'aux souris F, le régime hypercalorique et hyperlipidique C avait été administré durant les 12 premières semaines du programme nutritionnel. En effet, alors que la comparaison des résultats des paramètres biologiques et métaboliques des groupes F et G semblait ne montrer aucun effet bénéfique des AGPI-LC *n-3* sur la correction des profils dyslipidémiques, le passage sous régime A semblant

parfaitement suffisant, le régime B a certainement apporté aux souris G les composés neuroprotecteurs indispensables pour mieux résister au stress amyloïde que les souris F. L'analyse des compositions en acides gras dans les structures cérébrales essentielles à la mémoire devrait permettre de conforter encore cette thèse. Enfin, il faut rappeler que si les souris des groupes A à E étaient âgées de 12 mois au moment de l'injection cérébrale, les souris F et G avaient elles 15 mois. Ceci démontre si nécessaire que les effets neuroprotecteurs des AGPI-*lc n-3* doivent s'exercer dans les mêmes termes entre les 2 lots-âges de souris, renforçant de ce fait l'idée que les résultats obtenus avec ces 2 lots de souris soient comparables.

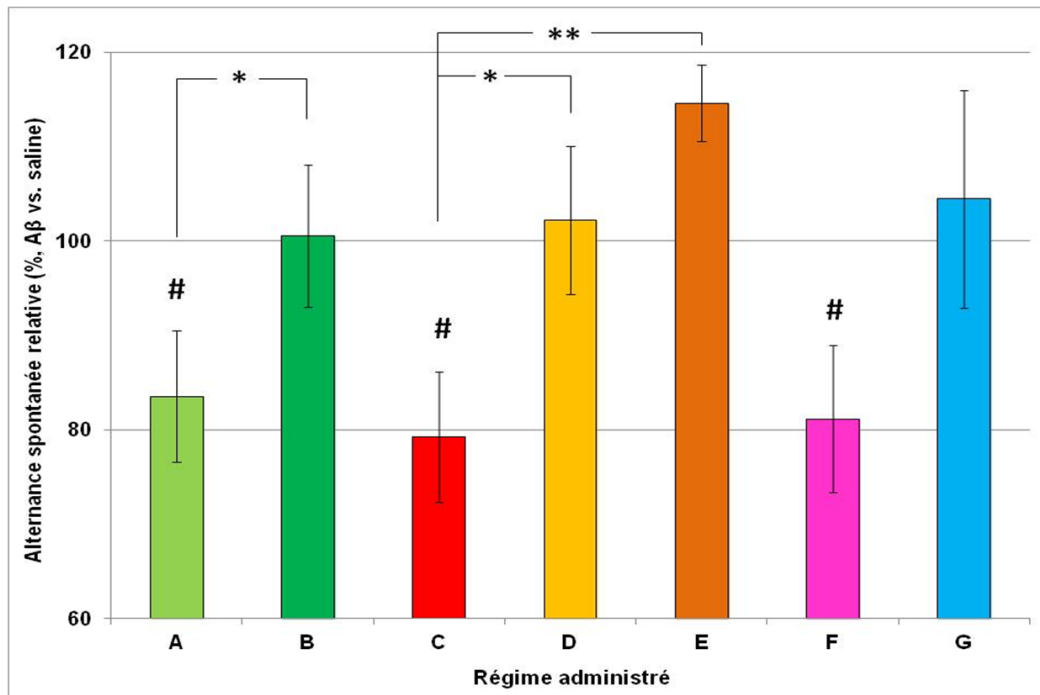


Figure 123 : Influence des régimes sur la mémoire spatiale des souris exposées à Aβ

Résultats indiqués : moyennes \pm SEM des souris traitées par Aβ vs. contrôles (saline) du même groupe-régime
 # : différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux souris contrôle (saline) du même groupe-régime

Enfin, il est intéressant de constater sur la que les taux moyens des souris sous régime E semblent même meilleurs que ceux des souris sous régime D (Figures 122 & 123), même si la dispersion des valeurs mesurées est trop grande pour atteindre une significativité statistique ($p = 0,099$). Néanmoins, cette amélioration est concrétisée par une différence plus nette avec le taux moyen des souris C ($p < 0,01$) que celle des souris du groupe D ($p < 0,05$). Ces résultats nous conduisent à la conclusion que la supplémentation nutritionnelle combinant les AGPI-*lc n-3* de l'huile de poisson aux polyphénols de l'huile d'olive vierge extra offre un bénéfice apparent plus marqué que l'huile de poisson seule sur la mémoire à court terme. Pour la première fois de cette étude, ceci suggère que ces 2 types de composés aient pu exercer des effets additifs ou synergiques contribuant ainsi à préserver, voire favoriser, cette capacité cognitive, même en conditions de stress amyloïde. Il aurait été intéressant d'évaluer les effets de la supplémentation nutritionnelle par les seuls polyphénols de l'huile d'olive vierge extra pour en évaluer les effets propres. Nous n'avons à ce jour pas pu doser précisément les composés de la fraction

phénolique de l'huile d'olive vierge extra, même si le tyrosol, l'hydroxytyrosol, l'acide caféique et l'oleuropéine ont été identifiés en raison de leurs teneurs prédominantes. Ces composés pourraient exercer des effets neuroprotecteurs de type antioxydant ou anti-inflammatoire (Raederstorff, 2009 ; Ghanim *et al.*, 2011 ; Kostyuk *et al.*, 2011), ce que nous n'avons pas pu vérifier dans cette étude. Mais il ne peut être exclu non plus que certains d'entre eux puissent activer divers mécanismes capables de favoriser la neurogenèse et la plasticité synaptique (Spencer *et al.*, 2009 ; Valente *et al.*, 2009 ; Williams & Spencer, 2012), comme il l'a été récemment rapporté pour les polyphénols du thé vert (Guedj *et al.*, 2009 ; Yoo *et al.*, 2010).

b. Apprentissage

Du 7^e au 11^e jour après l'injection (Figure 58), nous avons exploré les capacités d'apprentissage des souris conditionnées à un test contraignant, impliquant la nage forcée en piscine pour trouver une plateforme permettant de s'échapper du milieu liquide, aversif pour les animaux. La latence, correspondant au temps nécessaire pour que la souris trouve la plateforme immergée à l'aide des seuls repères spatiaux, doit diminuer chaque jour normalement, témoignant ainsi que l'animal apprend la tâche et mémorise l'emplacement de la plateforme pour pouvoir y retourner plus rapidement la fois suivante (Tableau 26). Une nouvelle fois, l'analyse ANOVA à 2 variables a permis de montrer que le traitement n'influe pas sur les résultats des latences cumulées, alors que la nature du régime exerce une influence très significative ($p < 0,0001$).

ANOVA	Somme des latences	
	F	p
Nature du régime	7,305	<0,0001
Traitement	1,014	0,3158
Nature x Traitement	2,493	0,0257

Tableau 26 : Effets du stress amyloïde sur les capacités d'apprentissage des souris (ANOVA à 2 facteurs)

Les profils d'apprentissage des souris témoins ayant subi l'injection de la solution saline véhicule ne paraissent pas différer de façon significative selon les régimes, toutes les souris ayant globalement été capables de rejoindre la plateforme plus rapidement en fin d'apprentissage qu'au début (Figure 124). Il faut toutefois noter que conformément aux observations préalables sur les tests cognitifs, les souris ont débuté cet apprentissage avec des capacités distinctes, puisqu'à J1, les souris du groupe B trouvent la plateforme en 20 secondes environ, alors que les souris des groupes C et F en nécessitent plus de 30. Par contre, après 5 jours de tests répétés, les souris de tous les groupes-régimes sont capables d'atteindre la plateforme en une dizaine de secondes, preuve de leur capacité d'apprentissage. Les régimes alimentaires exercent donc une influence qui prédispose différemment les souris à cette tâche, ce que confirment les résultats de latence cumulés sur les 5 jours (Figure 125). La supplémentation nutritionnelle en AGPI-*lc n-3* par l'administration des régimes B, D et G offre donc d'emblée des bénéfices qui se concrétisent par une amélioration des capacités cognitives des souris témoins.

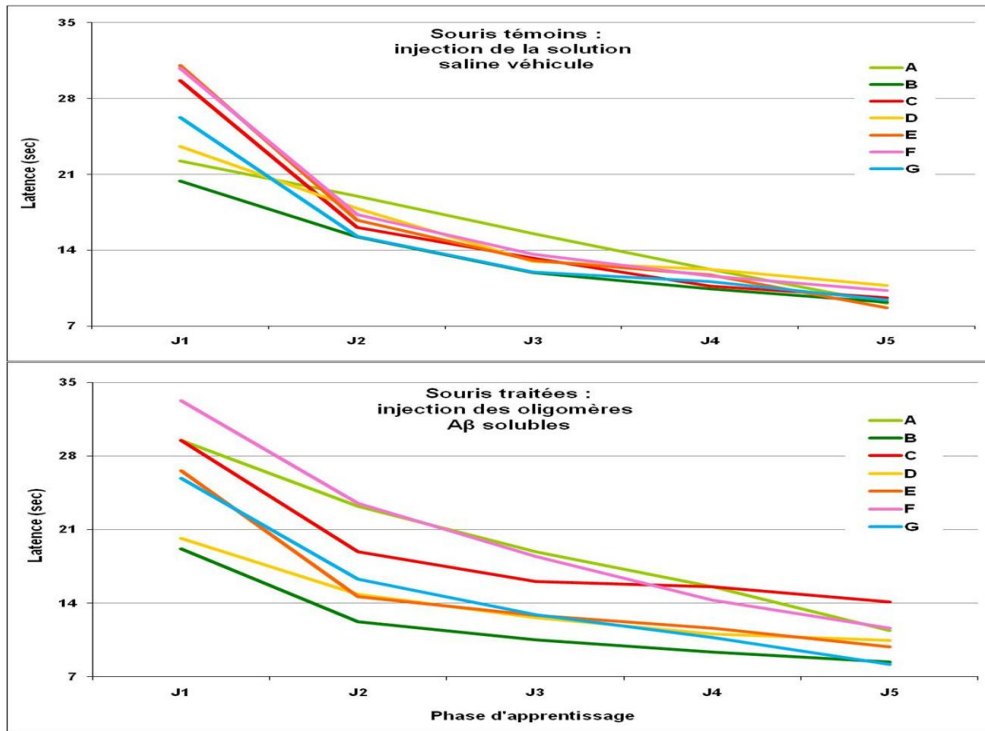


Figure 124 : Influence des régimes sur les capacités d'apprentissage (profils)

L'analyse des profils d'apprentissage des souris traitées par les oligomères A β montre certaines pentes moins fortes que sur les profils des souris témoins. Ceci reflète un apprentissage plus lent, synonyme de latences plus longues, résultant certainement de dysfonctionnements des réseaux neuronaux impliqués dans les processus mnésiques sous l'effet du stress amyloïde (Figures 124 à 127). Cependant, l'altération de ces performances cognitives concerne différemment les groupes, ce qui suggère une influence des régimes administrés.

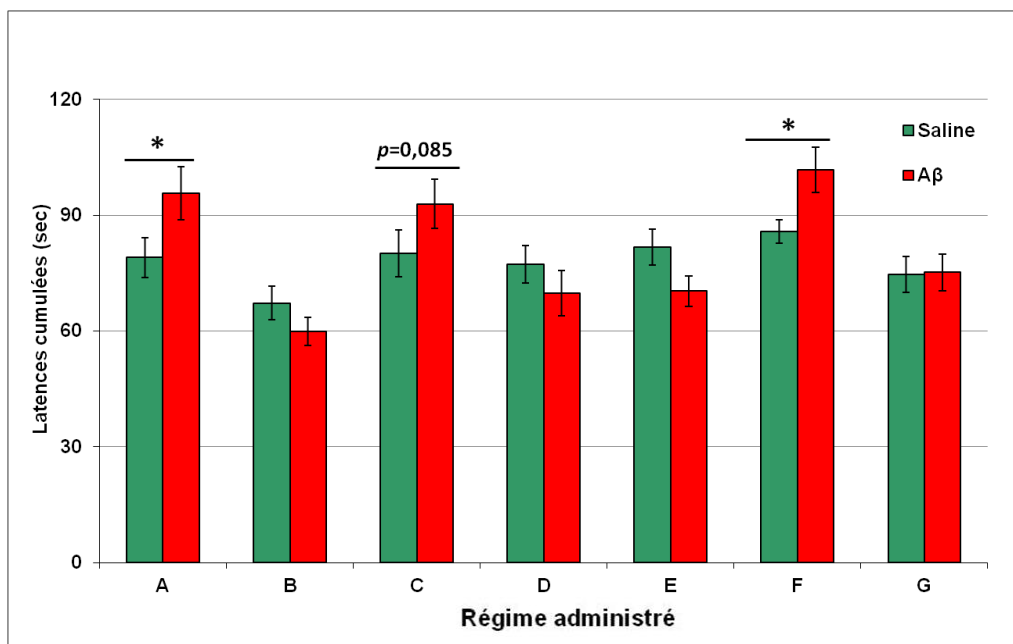


Figure 125 : Influence des régimes sur les capacités d'apprentissage (latences cumulées)

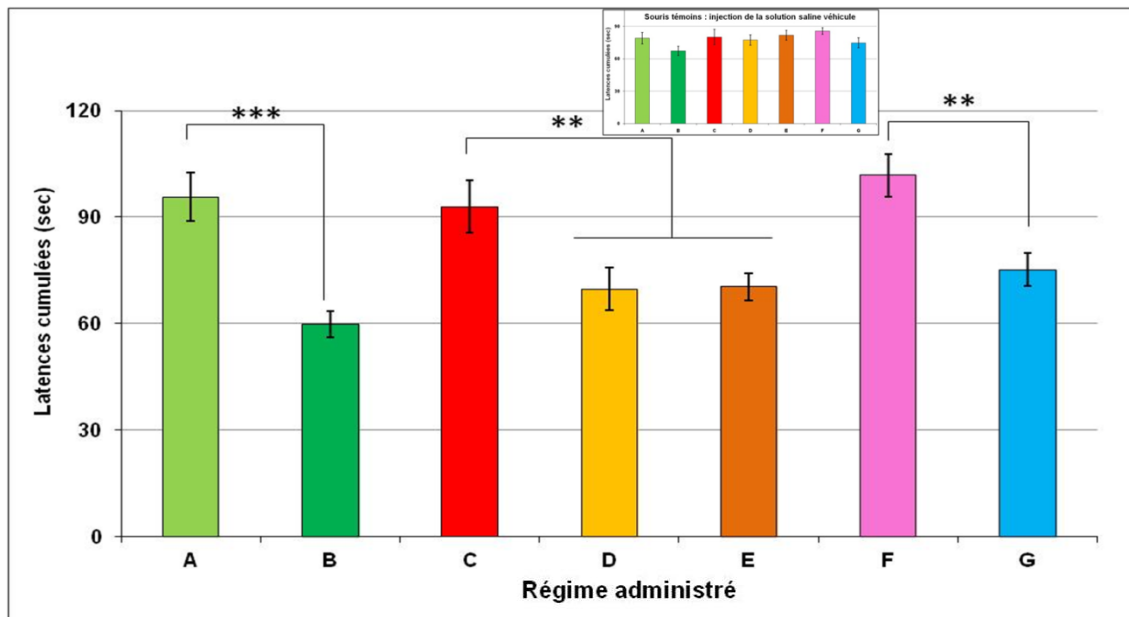


Figure 126 : Influence des régimes sur la sensibilité au stress amyloïde (apprentissage)
Graphique principal : après injection des oligomères A β ; insert : après injection de la solution saline

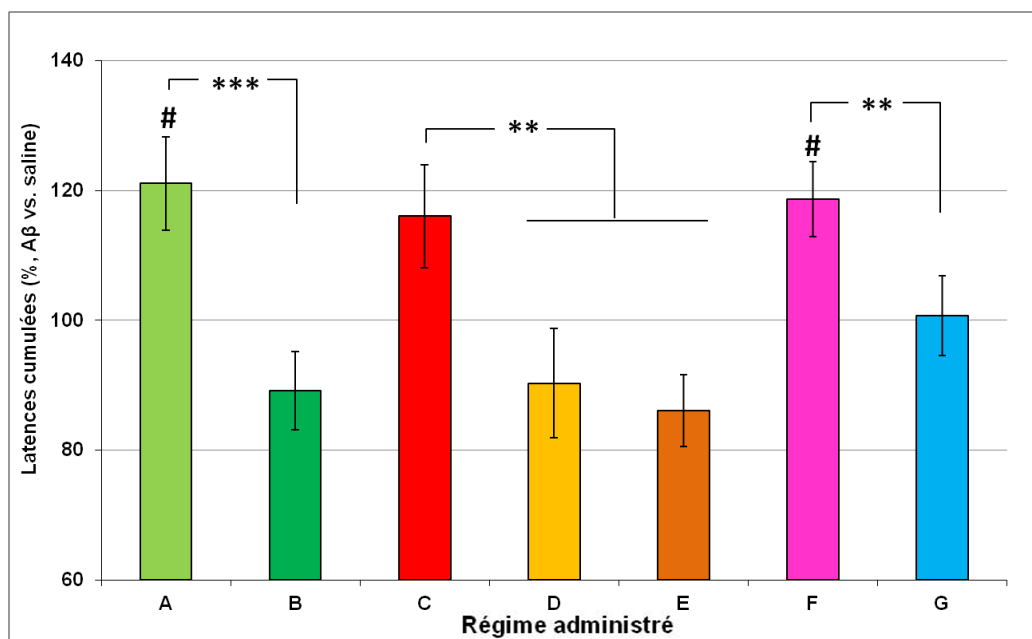


Figure 127 : Influence des régimes sur l'apprentissage des souris exposées à A β
*Résultats indiqués : moyennes \pm SEM des souris traitées par A β vs. contrôles (saline) du même groupe-régime
 # : différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux souris contrôle (saline) du même groupe-régime*

Les souris des groupes A, C et F tendent à perdre de leurs capacités à mémoriser une nouvelle tâche, significativement pour les groupe A et F ($p < 0,05$), non significativement pour le groupe C ($p = 0,085$), sous l'effet du stress induit par les oligomères A β . Inversement, les souris des groupes sous régimes B, D, E et G supplémentés en AGPI-*lc n-3* semblent ne pas avoir subi de stress amyloïde. Comme nous l'avons vu pour la mémoire à court terme (Figure 121), les souris du groupe E exposées aux oligomères A β se distinguent en tendant même à améliorer leurs performances ($p = 0,1709$) par

rapport aux souris témoins sous le même régime hyperlipidique supplémenté en huiles de poisson et d'olive vierge extra (Figure 123). Ce résultat mériterait d'être confirmé, d'autant que l'amélioration n'apparaît pas sur la représentation comparant les performances des seules souris traitées (Figures 125 & 126). C'est là le deuxième paramètre de cognition qui tendrait visiblement à être amélioré, suggérant un effet bénéfique exercé par la fraction phénolique de l'huile d'olive vierge extra, sans oublier les autres composés spécifiques éliminés lors du raffinage de cette huile.

c. Mémoire à long terme

L'exploration cognitive s'est achevée par l'analyse de la mémoire à long terme réalisée par la restitution d'une tâche imposée aux souris 3 jours après la fin de l'apprentissage, soit 14 jours après l'injection intracérébrale. La mémoire est d'autant plus élevée que la souris insiste en croisant souvent l'emplacement de la plateforme et en passant une grande partie du temps disponible (1 min) dans son quadrant. Les expériences ont été enregistrées pour éviter toute présence humaine autour de la piscine, ce qui a permis aussi d'analyser précisément et sur vidéo les diverses données prises en compte.

L'analyse ANOVA à deux variables menée sur les résultats obtenus s'est avérée très pertinente. Elle a permis de conclure que ni la nature du régime, ni la nature du traitement, ne semblent pouvoir influencer individuellement la mémoire à long terme. Elle a montré en revanche qu'en interagissant, ces variables peuvent exercer alors un effet significatif (Tableau 27).

ANOVA	Nombre de passages	
	F	p
Nature du régime	1,584	0,1576
Traitement	1,39	0,2408
Nature x Traitement	2,376	0,0333

Tableau 27 : Effets du stress amyloïde sur la mémoire à long terme des souris (ANOVA à 2 facteurs)

Pour chaque régime, les résultats obtenus montrent des différences assez peu marquées lorsque les performances des souris témoins sont comparées à celles des souris exposées aux oligomères A β solubles (Figure 128). Sous régime A néanmoins, les souris traitées sont passées moins souvent à l'emplacement présumé de la plateforme (en moyenne 6,3 fois au lieu de 3, $p < 0,01$), tandis qu'elles sont restées moins longtemps dans le quadrant de la plateforme (en moyenne 34% au lieu de 42%, $p = 0,08$). Ceci confirme bien que dans cette étude comme dans toutes les autres réalisées au laboratoire, la toxicité des oligomères ainsi administrés s'exprime sur la mémoire à long terme des souris sous régime standard, ce qui peut être visualisé 14 jours encore après l'injection.

Nous avons aussi constaté que les souris sous régime C exposées aux oligomères A β solubles ont assez peu répondu au stress amyloïde, avec une mémoire à long terme plus faible mais non significativement distincte ($p = 0,15$), alors qu'elles étaient logiquement attendues pour être plus sensibles que les souris sous régime A. Ceci doit nous inciter à interpréter avec précaution les résultats

obtenus sur la mémoire à long terme. Néanmoins, comme pour l'apprentissage, les souris sous régimes enrichis en AGPI-*lc n-3* ont montré des performances moyennes ayant plutôt tendance à s'améliorer, mais là encore, la variabilité interindividuelle des résultats a empêché toute significativité statistique.

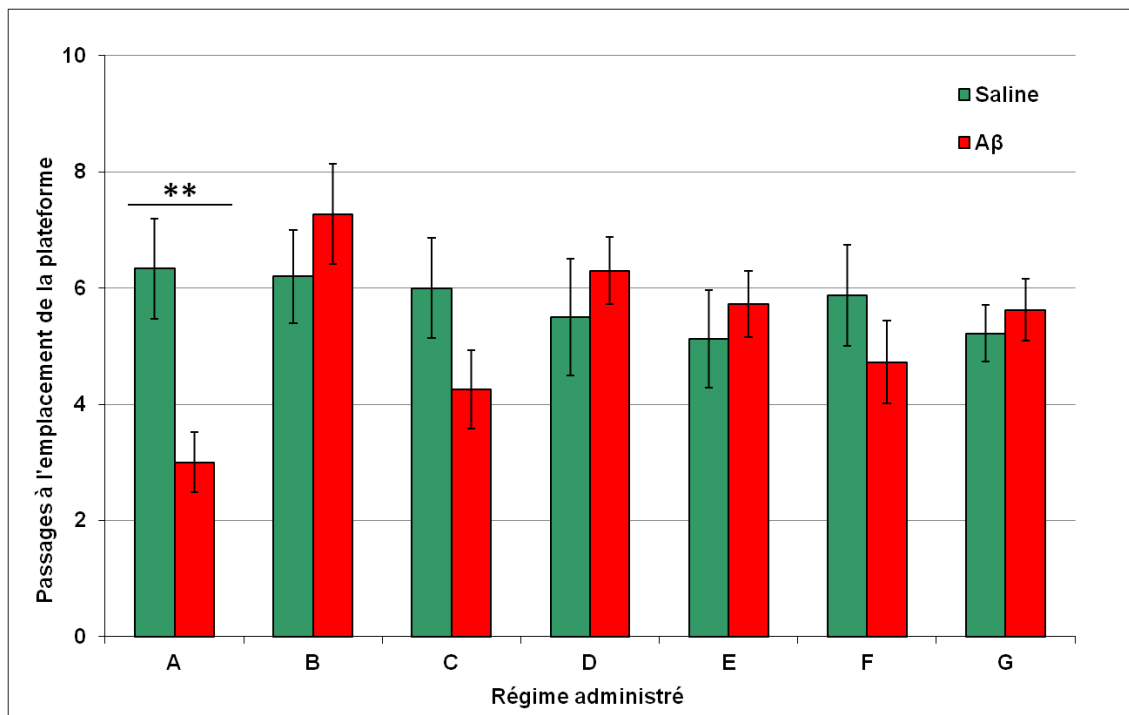


Figure 128 : Influence des régimes sur la mémoire à long terme

Aucune différence significative ne semble pouvoir distinguer les régimes sur la base de leur influence sur la mémoire à long terme des souris témoins, au moins d'après le nombre de passages à l'emplacement présumé de la plateforme et la part de temps passée dans le quadrant correspondant (Figures 129 & 130). L'empreinte mnésique paraît donc suffisamment forte chez les souris de tous les groupes pour leur permettre de telles performances trois jours après la fin de l'apprentissage. À l'inverse, les souris traitées par les oligomères Aβ solubles montrent des performances plus ou moins nettement améliorées selon le régime si de l'huile de poisson a été ajoutée à leur alimentation par rapport aux souris traitées sous régime homologue témoin (B vs. A et D vs. C). Sur la fonction cognitive qu'est la mémoire à long terme, les souris sous régime E semblent cette fois ne bénéficier d'aucun effet favorable lié à l'apport de polyphénols et autres composés de l'huile d'olive vierge extra, même si le régime mixte associant cette huile à des AGPI-*lc n-3* semble contribuer à préserver cette fonction et prévenir les effets délétères des oligomères Aβ par rapport au régime C ($p = 0,11$).

Pris dans leur ensemble, les résultats de l'évaluation cognitive montrent que les régimes supplémentés en huile de poisson apportent aux souris concernées des bénéfices quantifiables sur la mémoire spatiale lors du vieillissement (Figures 116 & 117) ainsi que dans des conditions pathogènes de stress amyloïde induit après l'injection intracérébrale des AβOs. Les effets neuroprotecteurs attribuables aux AGPI-*lc n-3* de l'huile de poisson consistent en l'amélioration, ou au moins la

préservation, des performances cognitives de ces souris en contribuant de manière significative à conserver des capacités d'apprentissage et de mémoire à long terme inaltérées. Les AGPI-*lc n-3* semblent donc bien capables à la fois de soutenir les souris contre le déclin cognitif lié à l'âge, mais aussi de leur offrir une protection totale contre le stress amyloïde et le développement d'un syndrome de déficit cognitif analogue à celui associé à la MA par le fait qu'ils préservent toutes les formes de mémoire testées dans le cadre de cette étude.

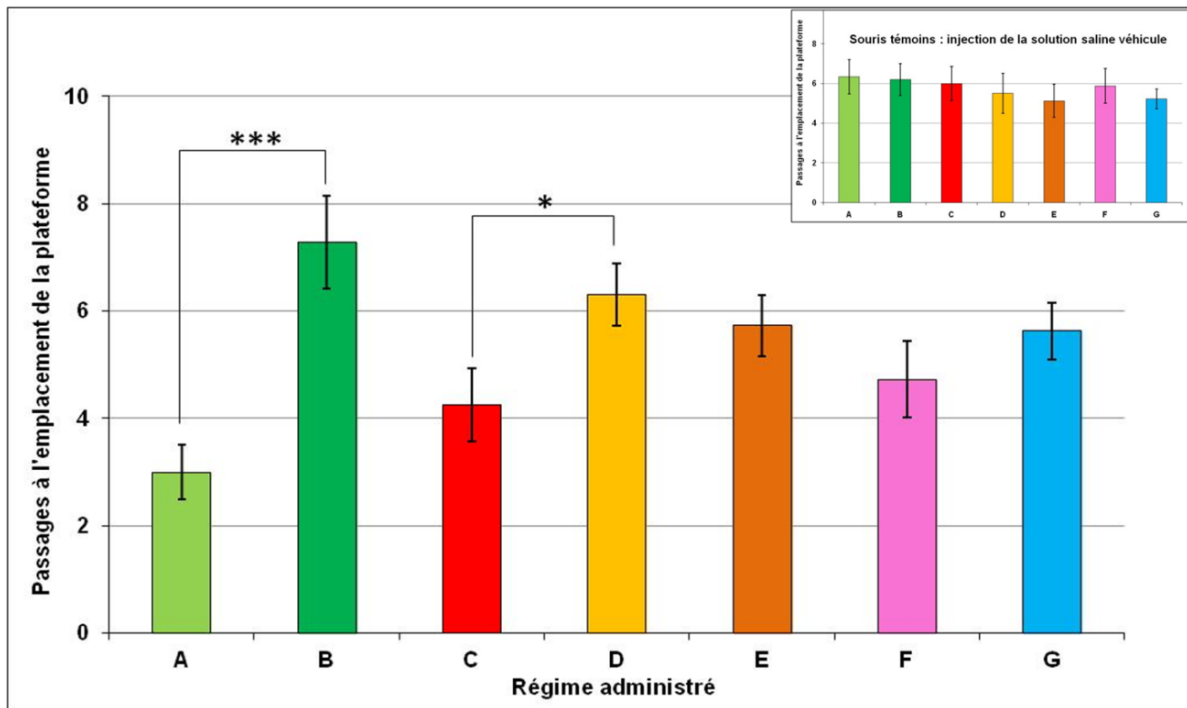


Figure 129 : Influence des régimes sur la sensibilité au stress amyloïde (mémoire à long terme)
Graphique principal : après injection des oligomères Aβ ; insert : après injection de la solution saline

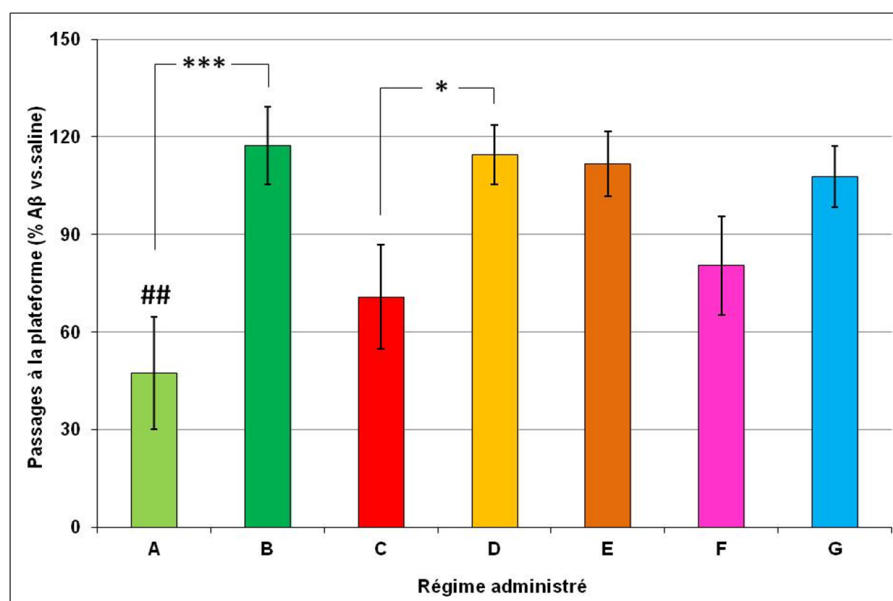


Figure 130 : Influence des régimes sur la mémoire à long terme des souris exposées à Aβ
Résultats indiqués : moyennes ± SEM des souris traitées par Aβ vs. contrôles (saline) du même groupe-régime

La supplémentation nutritionnelle simultanée en AGPI-*n-3* et en polyphénols de l'huile d'olive pourrait trouver un certain intérêt pour préserver les capacités de mémoire spatiale et d'apprentissage plus efficacement encore que les seuls AGPI, malgré les effets négatifs inexplicables observés sur les paramètres biologiques et métaboliques lors du suivi *in vivo* de l'étude. Mais ces résultats préliminaires méritent d'être comparés à des régimes contrôles hyperlipidique et normolipidique supplémentés uniquement par l'huile d'olive vierge extra, *i.e.* sans apport d'AGPI-*n-3*.

Les résultats des performances mnésiques trouvent leur cohérence renforcée par les corrélations parfois fortes mises en évidence entre les différents tests (Figure 131). Ceci confirme sans surprise que chacune des fonctions cognitives investiguées est corrélée aux autres, suggérant l'influence déterminante de paramètres communs, en particulier la composition des membranes neuronales en AGPI ou les niveaux des protéines synaptiques dont les résultats sont décrits et commentés dans le paragraphe suivant. À l'inverse, aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence entre les capacités cognitives évaluées par ces trois tests et les paramètres biologiques et métaboliques analysés ci-dessus, mais le test de corrélation des rangs de Spearman nous a conduits à constater que les taux de DHA (ainsi que, de façon comparable, les ratios *n-6/n-3*) érythrocytaires sont associés significativement à l'apprentissage et à la mémoire à long terme (Figure 131). Ceci démontre bien que l'apport nutritionnel d'AGPI-*n-3*, suivi par l'enrichissement en DHA dans les membranes des érythrocytes, influe sur les différents aspects des fonctions mnésiques et protège les souris contre le déclin cognitif.

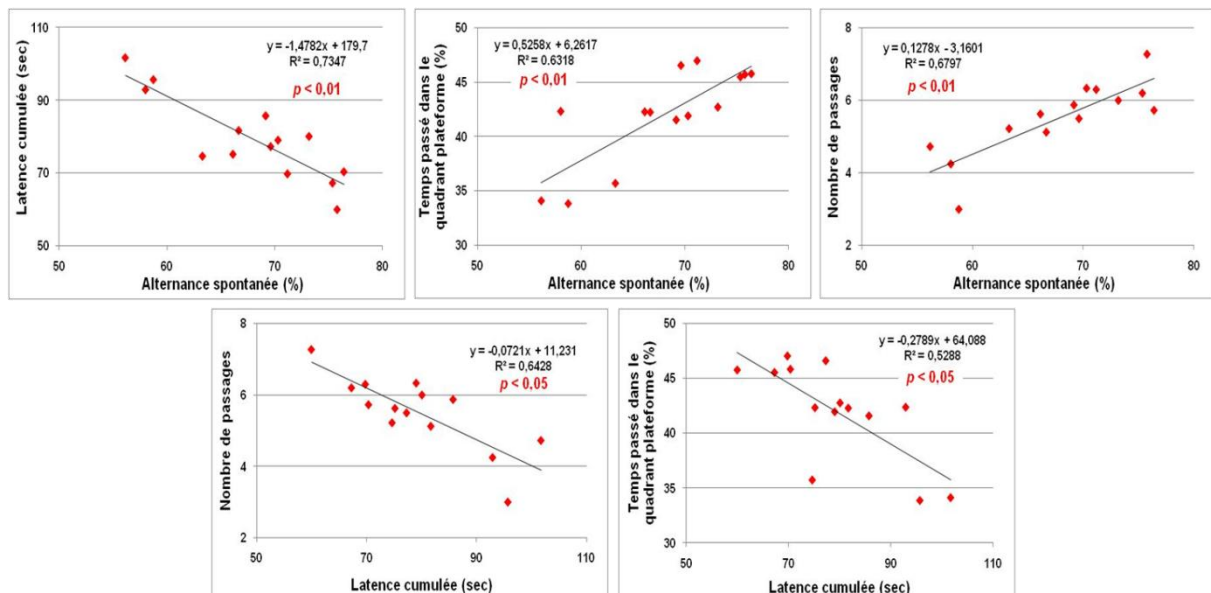


Figure 131 : Corrélations entre les capacités des différentes formes de mémoire

9. Analyses biochimiques des structures cérébrales

Les souris ont été sacrifiées sous anesthésie le 15^e jour après l'injection intracérébrale, c'est-à-dire dès le lendemain de l'achèvement du programme d'exploration cognitive. Différentes structures centrales, en particulier l'hippocampe, le cortex frontal et le cortex cérébral extra-frontal impliqués dans

les processus mnésiques, ont été prélevées. Pour chaque souris, le cerveau a été rapidement récupéré et ses deux hémisphères séparés. L'hémisphère droit où a été injectée la solution d'AβOs ou la solution saline véhicule a servi à la préparation des synaptosomes en vue des analyses protéiques par immunoblot. L'hémisphère gauche a lui été homogénéisé pour en extraire les AG en vue de leur dosage par CPG. La composition en AG et l'expression de protéines synaptiques ont été mesurées dans les structures cérébrales des souris des deux lots, âgées de 12,5 (« lot jeune ») ou 15,5 (« lot âgé ») mois au moment du sacrifice au terme du même programme nutritionnel testant les mêmes régimes.

a. Acides gras cérébraux

Nous avons étudié l'accrétion du DHA, l'enrichissement en AGPI-lc *n*-3 et l'impact sur les AGMI et AGS dans des membranes cérébrales des souris soumises aux différents régimes testés. Nous nous sommes focalisés sur l'hippocampe et le cortex, déterminants pour les fonctions cognitives, des souris du « lot jeune », celles qui ont donc permis d'étudier les effets du stress amyloïde après injection des AβOs. L'analyse ANOVA à deux variables nous a permis de constater que les teneurs cérébrales en AG étaient très significativement influencées par la nature du régime ($p < 0,0001$), alors que, sans surprise, ces teneurs ne semblent nullement varier en réponse au stress amyloïde (Tableau 28).

ANOVA	DHA		ARA/DHA		AGPI <i>n</i> -6/ <i>n</i> -3		AGMI		AGS	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Teneurs hippocampiques										
Nature du régime	44,261	< 0,0001	23,383	< 0,0001	66,878	< 0,0001	13,096	< 0,0001	33,424	< 0,0001
Traitement	2,739	0,105	0,495	0,4855	0,805	0,3744	0,283	0,5975	1,659	0,2044
Nature x Traitement	0,419	0,794	0,602	0,663	1,205	0,3222	0,344	0,8467	0,025	0,9987
Teneurs corticales										
Nature du régime	73,132	< 0,0001	70,771	< 0,0001	438,677	< 0,0001	59,486	< 0,0001	14,814	< 0,0001
Traitement	0,058	0,8115	0,444	0,5121	0,597	0,4481	0,44	0,5142	0,686	0,4165
Nature x Traitement	0,566	0,6901	1,726	0,1802	0,702	0,5987	0,595	0,6697	1,416	0,2616

Tableau 28 : Effets des régimes sur les taux d'acides gras cérébraux (ANOVA à 2 facteurs)

Nous avons tout d'abord comparé les taux d'AG dans le cerveau des souris de 12,5 et de 15,5 mois pour constater que sous un même régime, les niveaux des différents AG sont remarquablement similaires, comme en témoignent les ratios des AGPI *n*-6/*n*-3 (Figure 133). Il faut aussi remarquer la grande homogénéité des résultats au sein de chaque groupe-régime, ainsi que la similitude des profils d'AG entre les deux structures cérébrales étudiées.

Des différences sensibles dans les taux de DHA et donc dans les ratios *n*-6/*n*-3 ont néanmoins pu être constatées dans l'hippocampe des souris, bien davantage liées aux régimes administrés qu'à l'âge. Quel que soit l'âge des souris en effet, l'administration des régimes B, D, E et G contenant de l'huile de poisson permet d'enrichir en DHA (jusqu'à 40% en plus sous régime D vs. C) les membranes neuronales de l'hippocampe et ainsi d'en diminuer significativement les ratios *n*-6/*n*-3 par rapport aux souris sous régime homologue témoin A, C ou F. Cet enrichissement en AGPI-lc *n*-3 s'accompagne

d'une diminution tout aussi nette ($p < 0,001$) de la proportion des AGS et d'une augmentation concomitante ($p < 0,001$) de celle des AGMI. En fait, ces derniers changements n'ont été mesurés que chez les souris sous régimes D, E et G, alors que les souris sous régime B n'ont montré aucun changement de ces proportions par rapport à celles sous régime A, certainement parce que le mélange d'huiles végétales a été utilisée comme ingrédient commun à ces deux régimes. Comme attendu, les profils de composition des AG, tant en termes de taux relatifs que de variations sous l'effet des régimes, ont montré une parfaite similitude entre l'hippocampe et le cortex. Ceci indique que les mêmes processus régulant en particulier la capture et l'incorporation des AGPI-*lc n-3* doivent être fonctionnels dans ces structures cérébrales testées à des taux d'efficacité quasiment inchangés au moins jusqu'à l'âge de 15-16 mois chez la souris. Nous n'avons représenté que les résultats dans l'hippocampe (Figure 132).

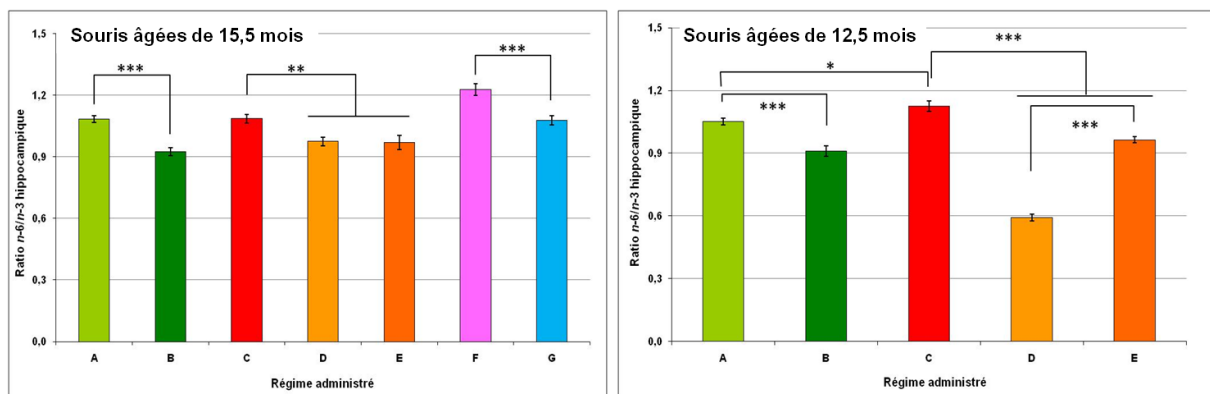


Figure 132 : Influence des régimes sur les teneurs en AGPI dans l'hippocampe des souris

La principale différence entre les 2 lots-âges réside dans le fait que les souris sous régime E montrent des taux de DHA incorporés beaucoup plus faibles ($p < 0,0001$) que les souris sous régime D, même si les teneurs restent évidemment bien supérieures à celles des souris sous régime C qui n'ont bénéficié d'aucune supplémentation en AGPI-*lc n-3*. Cette différence a été observée aussi bien dans l'hippocampe que dans le cortex, structures dans lesquelles les taux de DHA et les ratios des AGPI *n-6/n-3* sont très similaires et entre lesquelles des associations fortes ($\rho \geq 0,900$) semblent exister (Figure 133). Ceci suggère bien d'un effet particulier exercé par les polyphénols et les autres composés spécifiques de l'huile d'olive vierge extra sur la biodisponibilité ou en tout cas l'incorporation des AGPI-*lc n-3* dans les membranes cérébrales. De façon intéressante, nous avons déjà noté ci-avant une telle différence au niveau des teneurs en DHA dans les membranes érythrocytaires, certes chez les souris les plus âgées également (Figure 103). Il était donc intéressant de vérifier si les teneurs en DHA dans les érythrocytes, bien que plus faibles, étaient liées à celles dans les structures cérébrales. Aucune corrélation significative n'a été trouvée concernant les taux de DHA, alors que des liens semblent par contre exister entre le ratio des AGPI *n-6/n-3* érythrocytaires et celui de l'hippocampe ou du cortex (Figures 133 & 134). Les capacités cognitives des souris semblent donc sensibles non seulement aux taux de DHA, mais aussi à ceux de l'ARA, ces deux AGPI-*lc* étant réellement en compétition, tant pour

les enzymes qui assurent les voies de leur synthèse que pour leur localisation en position *sn-2* dans les phospholipides membranaires ou par l'antagonisme de leurs actions biologiques. Ces résultats sont en parfaite cohérence avec les ceux présentés dans la Partie A des Résultats (Figure 60) et rejoignent les données de la littérature (Hashimoto *et al.*, 2002 & 2005)

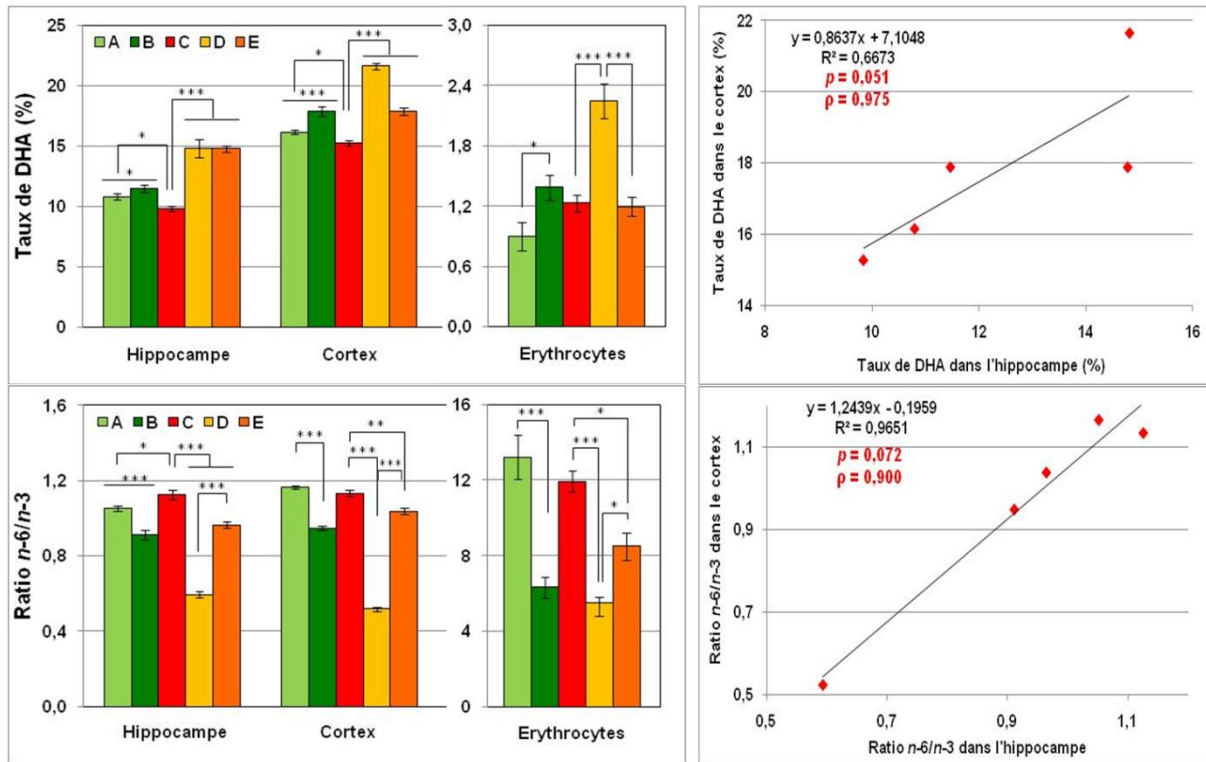


Figure 133 : Comparaison des effets des régimes sur les AGPI des divers tissus testés

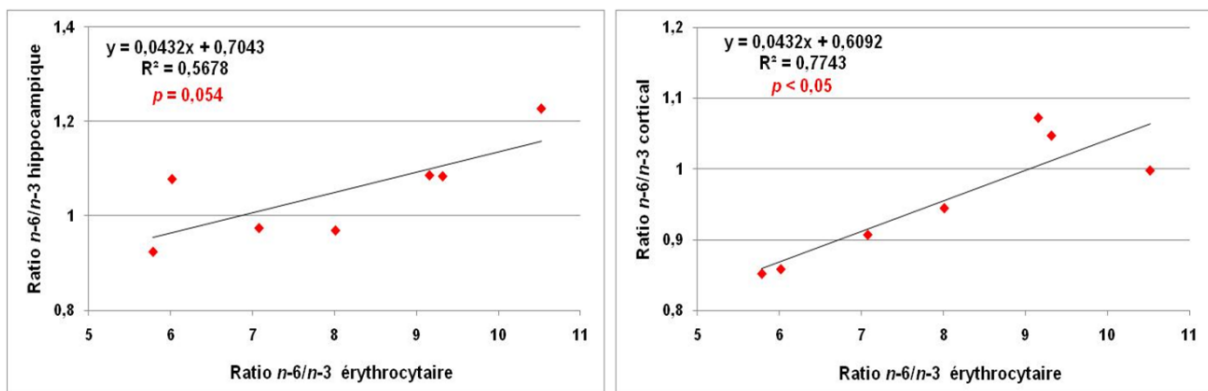


Figure 134 : Corrélations entre les ratios d'AGPI érythrocytaires et cérébraux

Pour terminer sur ce point, il faut souligner le fait que les taux de DHA cérébraux comme les ratios *n-6/n-3* sont relativement inchangés entre les souris sous régime C par rapport à celles sous régime A. Ceci suggère que le régime hyperlipidique tel que nous l'avons conçu ne produit pas de déséquilibres importants dans la composition générale en acides gras dans les membranes cérébrales. Le niveau de la dyslipidémie ainsi créée au niveau périphérique par l'administration de ce régime C n'a donc

visiblement pas été suffisant pour perturber en conséquence de façon significative l'homéostasie des AGPI dans le SNC. Ceci explique très certainement que les souris des groupes A et C ont toujours présenté entre elles des performances semblables tant en mémoire spatiale qu'à long terme ou en apprentissage. Dès lors, évidemment, qu'elles aient subi l'injection de la solution saline ou des oligomères A β solubles ne modifie en rien non plus la sensibilité et les réponses enregistrées au stress amyloïde ainsi généré.

À ce stade de l'analyse, la question la plus intéressante concerne la possibilité que les performances cognitives puissent être déterminées notamment par les teneurs en DHA et en AGPI *n*-3 mesurées dans le cortex ou l'hippocampe des souris témoins des différents groupes-régimes n'ayant subi aucune exposition aux A β O. Le test de corrélation par rangs de Spearman n'a pas permis d'identifier de corrélation significative avec la mémoire à court terme ou les capacités d'apprentissage ($\rho = 0,35$ et $p = 0,27$ au mieux), mais a distingué des associations plus robustes entre les taux hippocampiques de DHA ou les ratios des AGPI *n*-6/*n*-3 d'une part et la part de temps passée dans le quadrant de la plateforme lors du test de mémoire à long terme (Figure 135).

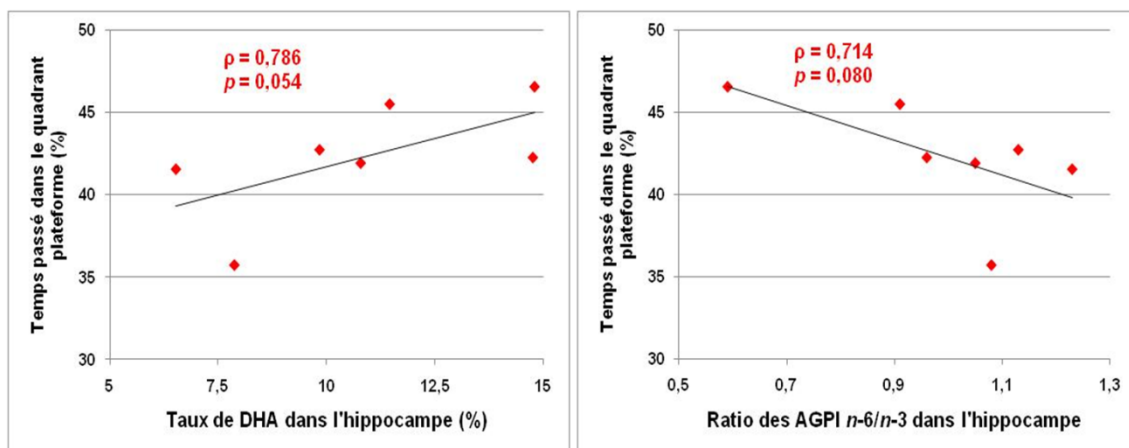


Figure 135 : Corrélations entre les AGPI dans l'hippocampe et la mémoire à long terme

Ces résultats suggèrent que les performances des souris à ce test d'évaluation mnésique dépendent des taux d'AGPI-*lc n*-3 accumulés dans l'hippocampe. Cette conclusion doit être pondérée par le fait que dans l'association impliquant le ratio *n*-6/*n*-3, un effet de levier pourrait résulter de la présence d'un point très éloigné des autres et correspondant aux valeurs des souris du groupe D montrant un ratio plus faible, ce qui pourrait induire un artefact et fausser les interprétations (Figure 135). Cependant, les résultats de la Partie A révèlent une association de ce type bien moins discutable dans l'hippocampe, ce qui confère davantage de crédit aux résultats de cette étude.

b. Protéines synaptiques cérébrales

En parallèle à la composition globale en acides gras dans les membranes cérébrales, nous avons étudié l'abondance relative de la protéine synaptique SNAP25 dans les fractions membranaires, les

synaptosomes, préparées à partir des structures hippocampiques et corticales isolées. L'apparition de la protéine SNAP25 est, comme d'autres protéines synaptiques comme la synaptophysine ou PSD-95, classiquement quantifiée pour suivre l'acquisition du phénotype neuronal durant la maturation cérébrale (Oyler *et al.*, 1991 ; Hepp *et al.*, 2000 ; Biranowska *et al.*, 2002 ; Bailey & Lahiri, 2006 ; Gottschall *et al.*, 2010). Inversement, même si quelques auteurs n'ont relevé aucun changement du taux de SNAP25 dans le cerveau de patients Alzheimer (Gyls *et al.*, 2004), sa disparition plus ou moins marquée est très souvent étudiée pour diagnostiquer l'altération de l'état fonctionnel des synapses dans diverses maladies neurologiques ou psychiatriques comme le syndrome de Down, la démence frontotemporale et la maladie d'Alzheimer (Mukaetova-Ladinska *et al.*, 2009 ; Connelly *et al.*, 2011). Nous avons montré qu'une exposition aux A β O et le stress amyloïde induit sont capables d'induire un dysfonctionnement et une perte synaptiques en particulier la disparition de SNAP25 (Figure 67). En évaluant la fonctionnalité synaptique par la préservation des taux de SNAP25 notamment, nous parvenons à définir le potentiel neuroprotecteur des AGPI-*lc n-3*, capables de prévenir la dégénérescence neuronale et le déclin cognitif dans divers modèles (Canas *et al.*, 2009 ; Garcia *et al.*, 2010).

L'injection des oligomères A β solubles n'ayant induit de toxicité que sur les souris du lot le plus jeune (âgées de 12,5 mois au moment de l'injection), nous n'avons analysé que les synaptosomes extraits de ces dernières. Étant donné leur nombre, nous avons procédé en 2 étapes distinctes : (1) l'analyse sélective par western blot des échantillons extraits des 3 souris de chaque sous-groupe choisies en raison de leurs réponses cognitives les plus marquées dans le sens des variations décrites ci-dessus par les performances moyennes des souris du sous-groupe ; (2) l'analyse systématique par dot blot de tous les échantillons de chaque sous-groupe, offrant l'avantage de pouvoir étudier simultanément un plus grand nombre d'échantillons, ce qui doit faciliter grandement les comparaisons.

L'analyse sélective des échantillons hippocampiques et corticaux a permis d'obtenir des résultats similaires, cohérents avec les observations cognitives. Les taux de protéines synaptiques ont été étudiés par immunoblot et quantifiés par évaluation densitométrique après numérisation. Les profils significatifs des échantillons hippocampiques sélectionnés ont été représentés pour illustrer les effets constatés (Figure 136). Comme le représente les résultats des quantifications (Figure 137), le stress amyloïde dû aux oligomères A β a induit une diminution significative du taux relatif de SNAP25 dans les synaptosomes d'hippocampe des souris des groupes A et C. Cette diminution suggère un dysfonctionnement synaptique qui peut vraisemblablement expliquer les déficits mnésiques observés ci-dessus. Conformément aux performances de mémoire et d'apprentissage, les souris ayant bénéficié d'un régime supplémenté en huile de poisson semblent avoir préservé des synapses fonctionnelles en dépit de l'exposition aux oligomères A β . Les résultats obtenus sur les membranes synaptiques des souris sous régime B se distinguent des autres par le fait que les taux relatifs de SNAP25 sont significativement augmentés ($p < 0,05$) par rapport à ceux des souris témoins du groupe A. Ce résultat suggère une augmentation de la plasticité synaptique sous l'effet des AGPI-*lc n-3*, ce qui est en accord avec les

propriétés synaptogéniques et neurogéniques du DHA (Cao *et al.*, 2009 ; Wurtman *et al.*, 2009 ; Su, 2010 ; Boneva *et al.*, 2011 ; Sakayori *et al.*, 2011).

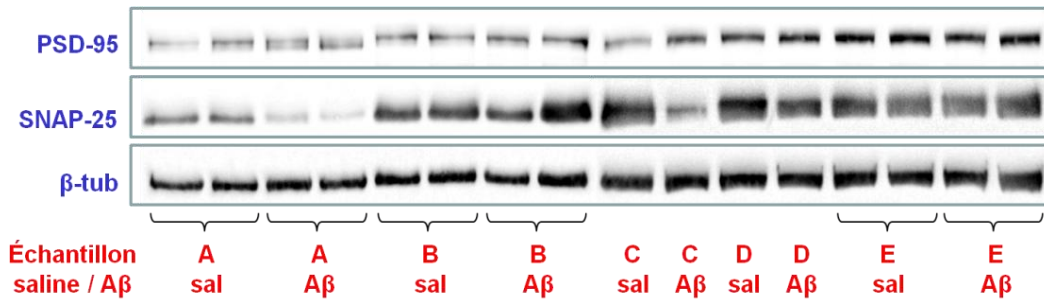


Figure 136 : Étude par immunoblot des protéines synaptiques de l'hippocampe (analyse sélective)

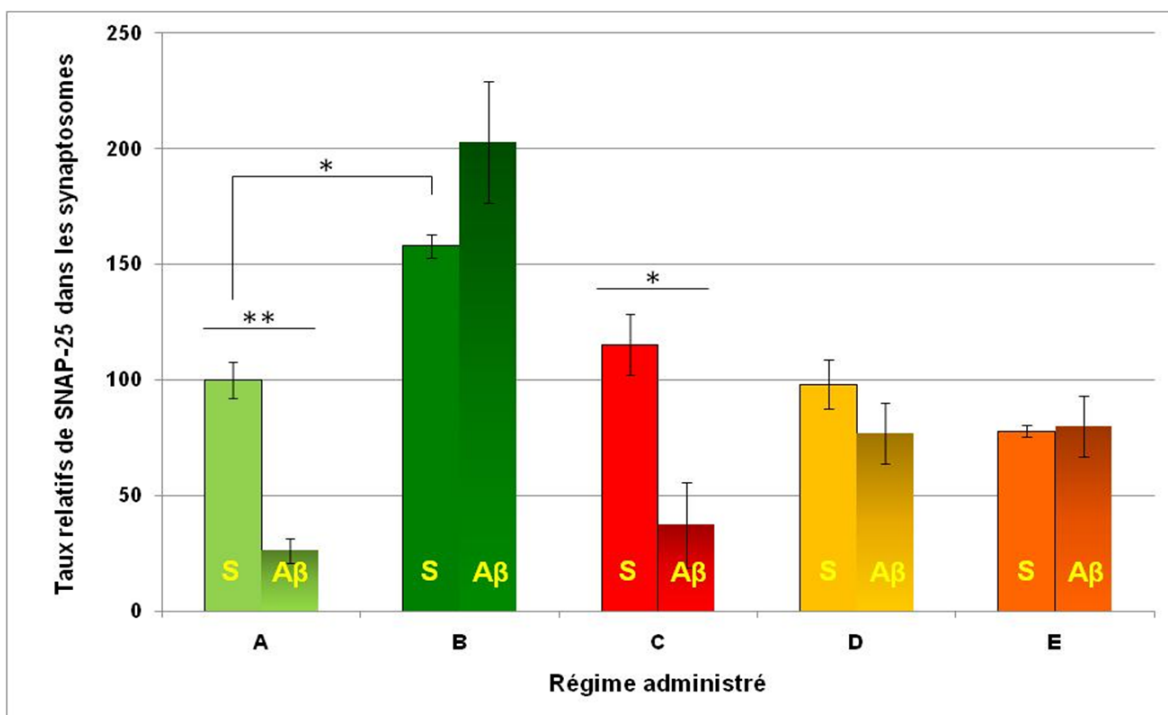


Figure 137 : Effets des régimes sur les protéines synaptiques de l'hippocampe (analyse sélective)
 Résultats (n=3, N=3) rapportés à la β -tubuline, exprimés en % comparativement aux souris A témoins (S)

Les résultats illustrés par la figure précédente ont donc été obtenus à partir des échantillons des souris sélectionnées selon leurs performances mnésiques. Nous avons donc procédé ensuite à la 2e étape, l'analyse systématique des échantillons préparés à partir de toutes les souris. L'analyse ANOVA à deux variables a permis de démontrer la très grande sensibilité des protéines synaptiques cérébrales, en particulier SNAP25, vis-à-vis de la nature du régime (Tableau 29). Plus encore que le traitement amyloïde, ces résultats confirment les hypothèses de base de ce projet : la composition lipidique des régimes est bien capable d'influer significativement sur les fonctionnalités synaptiques. L'analyse ANOVA indique aussi que l'effet des oligomères A β solubles semble davantage s'exercer au niveau du cortex cérébral qu'au niveau de l'hippocampe où l'injection a délivré les peptides toxiques.

ANOVA	Taux normalisé de PSD-95		Taux normalisé de SNAP-25	
	F	p	F	p
Niveaux hippocampiques				
Nature du régime	12,058	<0,0001	10,095	<0,0001
Traitement	0,012	0,9148	2,028	0,1606
Nature x Traitement	3,309	0,0176	4,096	0,006
Niveaux corticaux				
Nature du régime	4,835	0,0023	63,259	<0,0001
Traitement	10,462	0,0022	92,097	<0,0001
Nature x Traitement	0,396	0,812	30,164	<0,0001

Tableau 29 : Analyse systématique des protéines synaptiques cérébrales (ANOVA à 2 facteurs)

L'analyse systématique nous a conduits à observer des profils très différents (Figure 138) de ceux obtenus après l'analyse sélective, nous obligeant aussi à en reconsidérer certaines des conclusions. En effet, en prenant l'ensemble des souris de chaque sous-groupe, nous ne retrouvons plus la diminution significative de SNAP25 induite dans l'hippocampe des souris des groupes A et C exposées aux oligomères A β , même si le taux relatif de SNAP25 est très nettement diminué ($p < 0,0001$) dans les synaptosomes du cortex cérébral des souris du groupe A. Dans leur ensemble, ces résultats pourraient faire douter de l'existence-même d'un stress amyloïde si nous n'avions observé l'altération des capacités mnésiques des souris suite à l'exposition aux oligomères A β . Ces résultats diffèrent de ceux habituellement observés sur le modèle de neurotoxicité *in vivo* présentés dans la Partie A des Résultats ou sur d'autres études de notre laboratoire (Youssef *et al.*, 2008 ; Garcia *et al.*, 2010 ; Desbène *et al.*, 2012) et empêchent de conclure en l'effet neuroprotecteur éventuel d'un régime particulier. Les résultats obtenus à partir des échantillons du cortex suggèrent même que les régimes D et E ne contribuent à aucune amélioration de la sensibilité des synapses aux A β Os. Un point positif doit cependant être mis en exergue ici : l'analyse systématique a permis de conforter la conclusion déduite de l'analyse sélective selon laquelle les AGPI-*n*-3 apportés par le régime B a significativement augmenté le taux de SNAP25 hippocampiques, ce qui a aussi été observé avec les taux de la protéine post-synaptique PSD-95 dans cette même structure, mais pas dans le cortex (Figure 138).

Des études préalables menées au laboratoire ont déjà permis de constater que l'hippocampe et le cortex ne présentent pas nécessairement les mêmes profils des marqueurs synaptiques en réponse au stress amyloïde ou en présence d'agent neuroprotecteur comme le DHA. Ceci suggère que la cytotoxicité induite par les oligomères A β solubles puisse s'exprimer différemment sur les membranes pré- et post-synaptiques, pour des raisons encore inconnues. De même, les niveaux de protéine SNAP25 ont été rapportés inchangés dans le cortex des souris triple-transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer sous régime hyperlipidique, alors que dans le même temps la quantité de la protéine post-synaptique drébrine a été diminuée (Julien *et al.*, 2010). C'est pourquoi nous évaluons habituellement l'état des synapses en suivant en parallèle, comme le font aussi d'autres auteurs, les profils de marqueurs post-synaptiques tels que la protéine PSD-95, impliquée dans le complexe récepteur NMDA

au glutamate (Gyls *et al.*, 2004 ; Ahmed *et al.*, 2010b ; Garcia *et al.*, 2010 ; Sultana *et al.*, 2010 ; Desbène *et al.*, 2012). Mais les immunoblots sur PSD-95, à l'instar de ceux sur SNAP25, n'ont hélas apporté aucune information permettant de conclure que les membranes synaptiques aient été significativement perturbées par les oligomères A β .

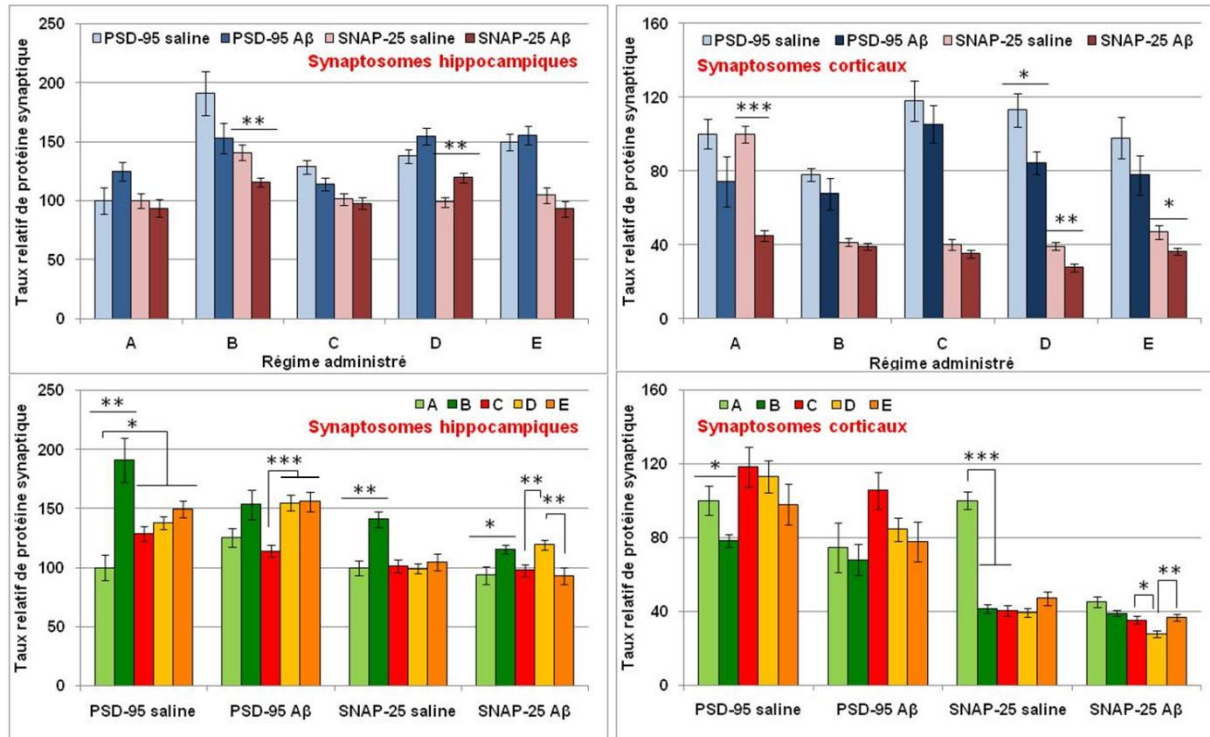


Figure 138 : Effets des régimes sur les protéines synaptiques (analyse systématique)

Pour chaque protéine, résultats rapportés à la β -tub, exprimés en % comparativement aux souris A témoins

Tous ces résultats des analyses biochimiques sur les structures cérébrales des souris sont assez délicats à interpréter et ne se prêtent guère à des conclusions simples et tranchées. Nous avons mis en évidence que le cerveau des souris des deux lots-âges avaient bénéficié d'un enrichissement comparable en AGPI-*n-3* et en DHA, en particulier sous l'effet des régimes alimentaires supplémentés en huile de poisson. Cet enrichissement a pu se traduire par des performances cognitives améliorées, au moins pour la mémoire à long terme, et par une résistance accrue contre les altérations mnésiques induites par le stress amyloïde. Il est intéressant de constater que ces bénéfices ont été identifiés sur les souris au terme du programme nutritionnel, c'est-à-dire après la disparition des effets bénéfiques observés à la 12^e semaine sur les paramètres biologiques et métaboliques. Il n'a pas été prévu dans cette étude d'appliquer le stress amyloïde après ces 12 semaines, mais par expérience, il est très vraisemblable que des effets neuroprotecteurs au moins comparables à ceux après 26 semaines auraient pu être observés en conséquence de l'administration de régimes enrichis en AGPI-*n-3*. Ceci suggère que, quoi qu'il ait pu arriver durant les 12-14 dernières semaines de l'étude *in vivo*, l'accrétion du DHA dans les membranes cérébrales produise des effets bénéfiques durables et persistants liés au turnover très lent de cet AGPI, dont la demi-vie a été évaluée à 30 mois dans le cerveau humain, soit 20 fois plus que dans tout autre

tissu (Umhau *et al.*, 2009 ; Cunnane *et al.*, 2012). L'analyse se complique si l'on cherche à expliciter l'amélioration des performances cognitives par la persistance ou la disparition des protéines synaptiques choisies, SNAP25 et PSD-95. Aucune n'a finalement apporté d'information fiable, puisque n'évoluant avec constance et cohérence ni dans le sens, ni en sens inverse des résultats de cognition ou des enrichissements en DHA dans les souris exposées au stress amyloïde.

L'une des hypothèses possibles pouvant expliquer cette discordance dans les résultats de l'analyse biochimique menée sur les structures cérébrales pourrait être que le stress amyloïde subi par les souris sensibles des groupes A et C de cette étude s'est avéré moins sévère que celui généré dans des conditions identiques lors de l'étude présentée dans la Partie A des Résultats ou lors d'autres études conduites au laboratoire. Le niveau de toxicité atteint dans les souris sensibles aurait été suffisant pour altérer les facultés mnésiques, mais peut-être pas pour perturber durablement et/ou gravement les fonctions synaptiques. Sous réserve que les protéines synaptiques choisies dans cette étude constituent en effet des marqueurs pertinents de l'état fonctionnel des synapses, ce que la littérature et notre expérience personnelle confirmeraient, il faudrait alors admettre que les capacités cognitives puissent être associées à des perturbations qualitatives qui n'affecteraient pas nécessairement les niveaux quantitatifs des protéines synaptiques. Une telle hypothèse suggérerait qu'il nous faille alors identifier d'autres marqueurs moléculaires plus sensibles et donc plus informatifs sur l'état réel des synapses.

Nous avons enfin voulu finir ces analyses des profils biochimiques des structures cérébrales en recherchant la présence de corrélations entre les protéines synaptiques et les performances mnésiques des souris indépendamment du traitement amyloïde. Alors qu'aucune association significative n'a été identifiée au niveau du cortex cérébral, il est apparu que les taux hippocampiques de protéine SNAP25 sont positivement corrélés aux capacités d'apprentissage et de mémoire à long terme (Figure 139). Ce résultat fort logique permet effectivement de conforter l'analyse quantitative de SNAP25 comme un moyen pertinent d'appréhender l'intégrité et la fonctionnalité des synapses.

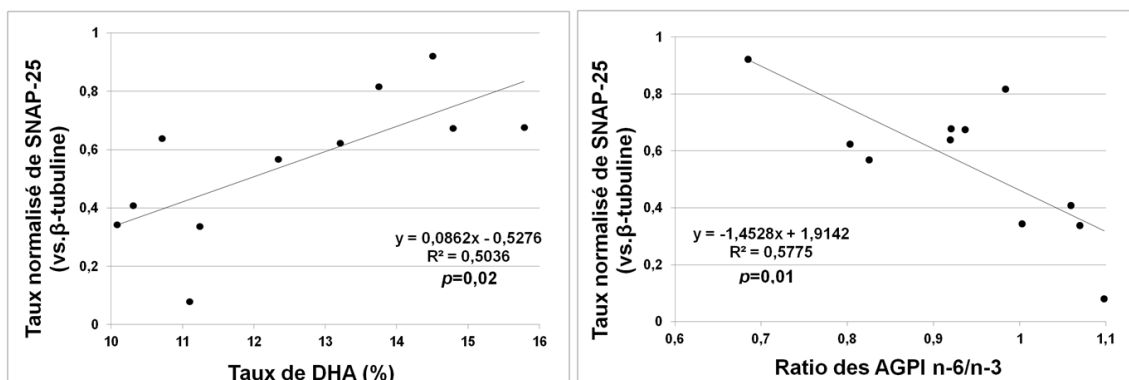


Figure 139 : Relations entre protéines synaptiques de l'hippocampe et capacités mnésiques

Enfin, pour compléter cette analyse, nous avons également constaté que la composition lipidique des membranes cérébrales est associée aux teneurs hippocampiques de SNAP25, significativement

corrélées de façon positive avec les taux de DHA ou d'AGPI *n*-3 (Figure 140). Ces deux derniers résultats soulignent de façon extrêmement claire l'impact déterminant des lipides alimentaires sur l'organisation et l'architecture des membranes synaptiques en lien avec la fonctionnalité des processus associés aux fonctions cognitives.

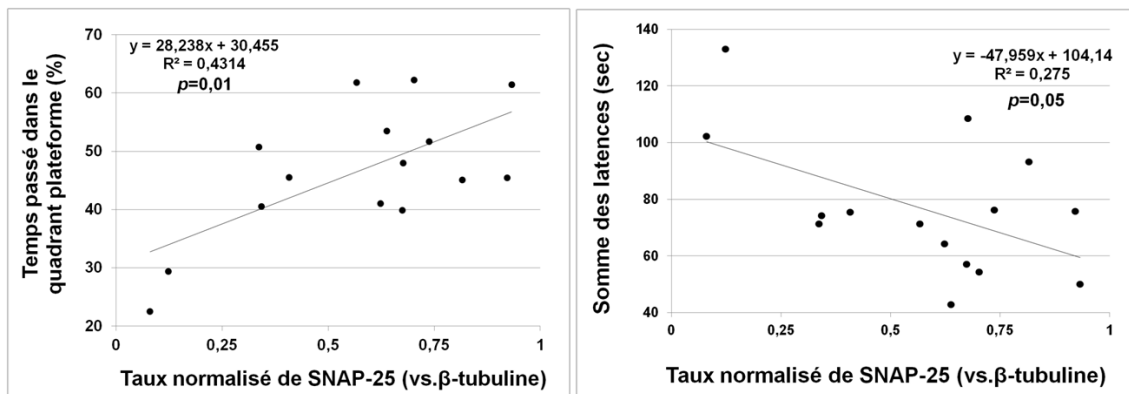


Figure 140 : Relations entre AGPI et protéines synaptiques dans l'hippocampe

10. Conclusions

Les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives représentent avec les cancers les pathologies dont les taux d'incidence chez les seniors sont les plus élevés. Outre l'âge qui est le facteur de risque qui pèse le plus sur ces maladies, les dyslipidémies déterminent des statuts de rupture de l'homéostasie lipidique de plus en plus fréquemment rencontrés dans les populations occidentales, précisément les plus concernées par ces maladies. Les recommandations d'ordre diététique adoptées depuis une vingtaine d'années par les programmes nationaux de nutrition et santé ont démontré leur efficacité dans la prévention des maladies cardiovasculaires et métaboliques. Pourtant, il semble que l'adoption de pareilles mesures ne soit pas encore tout à fait à l'ordre du jour pour développer des stratégies de prévention des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. La littérature scientifique apporte pourtant chaque jour de nombreuses indications sur cette perspective, tandis que l'émergence de conduites thérapeutiques à même de guérir ou de modifier efficacement la progression de la maladie tarde toujours malgré les efforts considérables et les moyens déployés pour y parvenir. Pour décrire trivialement la situation, il semble que la meilleure façon de guérir de la maladie d'Alzheimer soit encore de ne pas la développer... Notre étude s'inscrivait clairement dans cette logique.

Cette étude devait apporter la preuve du concept que la supplémentation alimentaire en DHA et en polyphénols peut limiter/empêcher l'effet dévastateur d'un régime occidental souvent trop riche en lipides sur l'obésité et la dyslipidémie, ainsi que sur la prédisposition aux maladies neurodégénératives, en particulier la maladie d'Alzheimer dont l'augmentation de la prévalence ne peut s'expliquer aussi simplement que par l'allongement de la durée de vie et le vieillissement. Sur la base de l'administration à des souris de régimes alimentaires proposant des apports lipidiques différents et éventuellement supplémentés en huiles de poisson et d'olive vierge extra, les résultats ont mené à plusieurs conclusions.

- La supplémentation alimentaire en DHA sous forme de TG permet de limiter l'obésité et la dyslipidémie induite par le régime hyperlipidique. Avec un apport énergétique quotidien supérieur, le régime C riche en AGS et cholestérol a permis d'induire une dyslipidémie caractérisée par des niveaux plasmatiques de cholestérol et de TG modérément augmentés, associés à une prise de poids plus marquée et un taux de masse grasse supérieur comparativement aux souris sous régimes normo-lipidiques A et B. En revanche, le régime hyperlipidique D, c'est-à-dire le régime C supplémenté en huile de poisson, empêche la prise de poids, l'augmentation du taux de masse grasse corporelle, ainsi que l'élévation des concentrations plasmatiques de cholestérol et de TG. Ceci confirme que les AGPI-*lc n-3* apportés sous forme de TG par l'huile de poisson sont parfaitement biodisponibles et que cette huile de poisson représente un ingrédient d'intérêt adapté pour les usages alimentaires. La supplémentation alimentaire en DHA a montré sa capacité à limiter ces effets et à compenser les effets délétères d'un apport alimentaire lipidique excessif, au moins durant une période (ici, les 12 premières semaines du programme nutritionnel). Par contre, au terme des 24 semaines du programme nutritionnel, les bénéfices métaboliques du régime D semblent avoir tous disparu et il faudra s'interroger sur les mécanismes qui ont pu être impliqués dans cette réponse biphasique.

- La supplémentation en DHA permet de protéger du déclin cognitif induit par le régime hyperlipidique. Les souris sous régime hyperlipidique C « non compensé » ont montré un déclin cognitif avec l'âge plus marqué que celles ayant bénéficié de la supplémentation nutritionnelle en AGPI-*lc n-3* et de l'enrichissement consécutif des membranes cérébrales en DHA. Seuls les régimes supplémentés en huile de poisson (B, D et E) parviennent à préserver la mémoire à court terme lors du vieillissement. Les effets bénéfiques sur la cognition auxquels a contribué le DHA pourraient reposer sur l'accroissement de la réserve cognitive et favoriser la plasticité synaptique, comme le suggère l'augmentation des taux de la protéine SNAP25 observée dans les membranes synaptiques extraites à partir de l'hippocampe des souris du groupe B comparativement à celles du groupe A. Les fonctions cognitives ainsi favorisées par les taux préservés de protéines synaptiques dépendraient donc des taux cérébraux d'AGPI-*lc n-3*, eux-mêmes directement contrôlables par un apport nutritionnel approprié.

- La supplémentation en polyphénols renforce les effets protecteurs du DHA sur la cognition. L'association de l'huile de poisson à une huile d'olive vierge extra, riche en polyphénols notamment (groupe E), a permis d'observer un effet hypocholestérolémiant intéressant, mais le plus souvent, la présence des polyphénols de l'huile d'olive semble avoir induit des interactions antagonistes contrariant les effets bénéfiques du DHA sur la masse corporelle, la masse grasse, les autres marqueurs plasmatiques et même sur les taux d'enrichissement en AGPI *n-3* des tissus (érythrocytes, hippocampe, cortex). Mais il n'en est pas de même sur la cognition. En effet, même si cette étude ne permet pas de conclure à un effet bénéfique propre des polyphénols sur la cognition, nous avons constaté qu'après exposition aux oligomères A β , les souris du groupe E tendent à de meilleures capacités de mémoire à court terme (mémoire spatiale) et d'apprentissage que celles du groupe D. Il est probable toutefois que

les concentrations de la fraction phénolique de l'huile d'olive vierge extra soient appropriées aux effets que nous souhaitons investiguer, ni même que les molécules qui la composent soient suffisamment biodisponibles et douées des activités protectrices requises pour agir en synergie avec les AGPI-lc *n-3* dans le SNC. Rappelons enfin que plusieurs publications récentes soulignent l'impossibilité de prédire avec précision les effets d'ingrédients bioactifs intégrés dans des combinaisons alimentaires complexes en raison d'interactions et d'interférences absentes des études menées sur les ingrédients administrés séparément. Tous ces aspects sont essentiels dans la perspective d'applications en nutrition humaine et devront être étudiés en détail afin de préciser les résultats de cette étude.

- Les souris obèses sont plus sensibles à la toxicité du peptide A β . Depuis le démarrage de cette étude, la littérature s'enrichit chaque mois d'une dizaine d'articles en moyenne, confirmant de façon unanime le déclin cognitif accéléré et l'altération de la plasticité cérébrale en conséquence de phénotypes dyslipidémiques telles que l'obésité ou le syndrome métabolique. De tels changements sont connus pour affecter la réserve cognitive et ainsi sensibiliser les neurones au stress amyloïde. Bien que nous n'ayons pu nous-mêmes le constater dans cette étude, nous considérons que cette sensibilisation est cohérente avec l'accélération du déclin cognitif notée chez les souris du groupe C. Il est vraisemblable que le niveau de dyslipidémie et de troubles métaboliques obtenu soit resté trop modéré pour pouvoir rendre ces souris en surpoids significativement plus sensibles à la toxicité des oligomères A β . Une nouvelle étude dans des conditions plus marquées devrait apporter une réponse définitive.

- La supplémentation en DHA (et en polyphénols) limite l'impact cognitif de l'exposition au peptide A β chez les souris sous régime hyperlipidique. Même si nous n'avons pu montrer clairement une sensibilité accrue au stress amyloïde chez les souris en surpoids sous régime C, nos résultats indiquent sans la moindre ambiguïté que la supplémentation en DHA et en AGPI-lc *n-3* permet aux souris sous régime hyperlipidique D ou E contenant de l'huile de poisson de conserver des capacités cognitives inaltérées après l'exposition aux oligomères A β , tout comme les souris sous régime normolipidique B lui aussi enrichi en huile de poisson. Les multiples effets bénéfiques des AGPI-lc *n-3* sont donc capables de s'exprimer avec la même efficacité, qu'ils soient ajoutés dans un régime normolipidique ou hyperlipidique. Cette information d'ordre diététique est certainement très intéressante en vue d'interventions nutritionnelles dans des contextes alimentaires pas toujours parfaitement maîtrisés.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

L'un des phénomènes marquants de ce début de XXI^e siècle est le vieillissement de la population, c'est-à-dire l'allongement de la durée de vie et en conséquence, l'augmentation considérable du nombre et de la proportion de personnes âgées, notamment dans les pays industriels. Avec ce vieillissement accéléré, la maladie d'Alzheimer comme les autres types de démence, ainsi que toutes les pathologies chroniques liées au vieillissement sont devenues un problème majeur de santé publique. En effet, le bénéfice de cette « prolongation de vie » est très directement lié à l'impression de bien-être des personnes âgées, elle-même dépendant de la durée de vie sans pathologie lourde ou invalidante. Ainsi, en France métropolitaine, la persistance d'une progression globale de notre espérance de vie à la naissance d'un trimestre par an se heurte à la stagnation, voire au recul, de l'espérance de vie en bonne santé, *i.e.* sans limitation d'activité ou sans incapacité majeure, reflétant sans doute les résultats globaux des politiques de santé nettement en faveur de la médecine thérapeutique. En tout cas, si la quantité de vie s'accroît, la qualité de vie ne semble pas évoluer en parallèle.

L'aspect évolutif des mécanismes pathogènes mis en jeu dans le développement des maladies liées au vieillissement incite largement à considérer l'intérêt d'interventions préventives dès le milieu de vie, permettant d'envisager la montée en âge vers un vieillissement normal ou réussi, minimisant ainsi les risques de développer ces diverses maladies ou au moins ralentissant les processus délétères afin d'en retarder la survenue. Développer de telles approches préventives est d'autant plus important pour la maladie d'Alzheimer qu'aucune mesure thérapeutique n'a encore été développée permettant de soigner efficacement la maladie, ni même d'en empêcher l'évolution et le terme fatal. Dans ce contexte, les méthodes nutritionnelles apparaissent comme une stratégie réaliste capable de préserver les capacités cognitives, limiter le vieillissement cérébral et enrayer l'augmentation automatique de la prévalence de la maladie avec la croissance des populations des 3^e et 4^e âges.

Les connaissances acquises au cours des dernières années grâce aux études épidémiologiques, cliniques et précliniques ont permis de révéler l'importance de l'apport alimentaire en AGPI *n*-3 pour la physiologie du système nerveux. À ce titre, la littérature scientifique a très largement identifié ces acides gras comme des molécules globalement protectrices, biodisponibles et faciles à consommer ou administrer, des qualités pouvant faire d'eux les éléments clés de stratégie préventives vis-à-vis du développement de différentes pathologies, et particulièrement la maladie d'Alzheimer. Ces effets neuroprotecteurs pourraient être davantage potentialisés en couplant les AGPI *n*-3 à d'autres composés doués de propriétés antioxydantes et/ou anti-inflammatoires. La poursuite des recherches dans le domaine de la nutrition lipidique et du cerveau est indispensable pour mieux comprendre les mécanismes spécifiques des AGPI *n*-3 qui concourent au maintien des fonctions cérébrales, et définir

les besoins nutritionnels réels et spécifiques des différentes catégories de la population, notamment chez les personnes âgées. Cette thèse ambitionnait de valider fonctionnellement des composés alimentaires à allégation « bien vieillir » capables de prévenir le vieillissement cérébral et les maladies neurodégénératives. Les objectifs que nous nous étions fixés au début de ce travail de thèse semblent donc avoir été globalement tenus.

Nous avons réussi à confirmer que le modèle animal ainsi développé au sein de notre laboratoire, modèle d'altérations précoces de la MA, est particulièrement pertinent pour l'évaluation expérimentale du potentiel neuroprotecteur d'ingrédients ou de préparations alimentaires préventives de la MA. Ainsi, une injection ICV unique d'A β Os en concentration subnanomolaire pourrait induire des dysfonctionnements synaptiques éventuellement liés à une perte de différentes protéines synaptiques indispensables pour les fonctions cognitives, ce qui expliquerait les altérations des capacités mnésiques des souris exposées. En revanche, l'enrichissement membranaire des neurones en AGPI-*lc n-3*, en DHA surtout, pourrait préserver les protéines synaptiques même en présence du peptide A β , préservant par conséquent les performances cognitives. Nos résultats soulignent également qu'une supplémentation nutritionnelle durant un mois semble suffisante chez la souris pour pouvoir mesurer un enrichissement significatif dans les diverses structures cérébrales. Des teneurs suffisantes en DHA, l'AGPI majoritaire dans le cerveau, peuvent donc être maintenues par l'apport alimentaire. En préservant les fonctions cognitives, le DHA pourrait être à la base de stratégies nutritionnelles pour prévenir ou retarder la MA.

L'ester DHA-AV présente également une biodisponibilité *in vivo* plus élevée et des propriétés neuroprotectrices plus marquées *in vitro* contre la toxicité de peptide A β . Ces résultats devraient, donc, permettre de jeter les bases d'études plus complexes, afin de potentialiser les effets bénéfiques propres à chacun. D'autres études seraient donc suivies *in vitro* et *in vivo* pour mieux comprendre les mécanismes neuroprotecteurs de ce composé bimodulaire.

La supplémentation alimentaire en DHA, sous forme d'ester éthylique ou de triglycéride, permet de limiter le surpoids et la dyslipidémie modérée, et de protéger du déclin cognitif induit par un régime hyperlipidique. L'origine de l'amélioration des performances constatées et des protéines synaptiques est sans aucun doute l'enrichissement des membranes cérébrales en DHA.

La supplémentation alimentaire en polyphénols renforce les effets protecteurs du DHA sur la cognition, c'est en tout cas ce que nous espérions pouvoir démontrer sur des souris auxquelles un régime hyperlipidique a été administré. Malgré un effet hypocholestérolémiant intéressant, l'association étudiée n'a pas réellement prouvé son intérêt. En effet, l'association huile de poisson – huile d'olive vierge extra a souvent conduit à des résultats intermédiaires entre les souris sous régime hyperlipidique non supplémentées ou supplémentées en huile de poisson seulement. Ceci suggère que l'huile d'olive vierge extra puisse contenir des composés, dont la fraction phénolique, susceptibles d'induire des interactions antagonistes à même de contrarier les effets bénéfiques du DHA sur la masse corporelle, la

masse grasse, les marqueurs plasmatiques, et même sur les taux d'enrichissement en AGPI *n*-3 des tissus (érythrocytes, hippocampe, cortex). Malgré ces effets propres, les composés de l'huile d'olive vierge extra ne semblent pas avoir empêché les effets bénéfiques exercés par le DHA sur la cognition. Nous avons même pu constater une tendance à l'amélioration des capacités de mémoire à court terme (mémoire spatiale) et d'apprentissage des souris exposées aux oligomères A β solubles par rapport aux souris supplémentées seulement en huile de poisson. Ceci suggère que l'huile d'olive vierge extra contienne des molécules lipophiles capables de rejoindre le système nerveux central pour y exercer des effets, bénéfiques *a priori*. N'ayant pu évaluer les effets d'une supplémentation en huile d'olive vierge extra seulement, il nous est impossible de spéculer sur les propriétés de ces composés. Il n'est pas non plus certain que les concentrations de la fraction phénolique de l'huile d'olive vierge extra soient appropriées aux effets que nous souhaitons investiguer, ni même que les molécules qui la composent soient suffisamment biodisponibles et douées des activités protectrices requises pour agir en synergie avec les AGPI-LC *n*-3 dans le système nerveux central. Rappelons enfin que plusieurs publications récentes soulignent l'impossibilité de prédire avec précision les effets d'ingrédients bioactifs intégrés dans des combinaisons alimentaires complexes en raison d'interactions et d'interférences absentes des études menées sur les ingrédients administrés séparément. Tous ces aspects sont essentiels dans la perspective d'applications en nutrition humaine. Ils doivent être étudiés en détail afin de confirmer les résultats préliminaires de cette étude et de pouvoir conclure très clairement sur cet attendu.

Le régime hyperlipidique administré n'a pas permis d'obtenir des souris montrant un degré d'obésité et de dyslipidémie suffisant pour évaluer la sensibilité au stress amyloïde par rapport aux souris sous régime normolipidique. Il serait intéressant de reproduire cette étude durant un temps plus court, trois mois maximum, afin d'évaluer la sensibilité aux oligomères A β solubles de souris présentant un statut lipidique plus dégradé et confirmer l'impact de ce statut sur le déclin cognitif avec l'âge.

Pour conclure, les AGPI-lc *n*-3 ont montré leur capacité de contribuer à lutter contre les effets délétères de l'obésité ou de la dyslipidémie en corrigeant les anomalies de l'homéostasie lipidique, ainsi qu'en renforçant ou en préservant les capacités cognitives. Ces propriétés semblent parfaitement intéressantes pour construire autour d'eux des approches nutritionnelles adaptées, destinées principalement aux seniors, jeunes et moins, et capables de prévenir efficacement les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives pour lesquels la dyslipidémie est un facteur de risque commun lors du vieillissement. La perspective de leur associer éventuellement des polyphénols reste attrayante, mais sa pertinence doit encore être établie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abad-Rodriguez, J., Ledesma, M.D., Craessaerts, K., Perga, S., Medina, M., Delacourte, A., Dingwall, C., De Strooper, B., and Dotti, C.G. (2004). Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *J. Cell Biol.* 167, 953–960.
- Abramov, A.Y., Ionov, M., Pavlov, E., and Duchon, M.R. (2011). Membrane cholesterol content plays a key role in the neurotoxicity of β -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Aging Cell* 10, 595–603.
- Ahmad, A., Moriguchi, T., and Salem, N. (2002). Decrease in neuron size in docosahexaenoic acid-deficient brain. *Pediatr. Neurol.* 26, 210–218.
- Ahmed, A., and Tollefsbol, T. (2001). Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. *J Am Geriatr Soc* 49, 1105–1109.
- Ahmed, T., Enam, S.A., and Gilani, A.H. (2010). Curcuminoids enhance memory in an amyloid-infused rat model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 169, 1296–1306.
- Ahmed, R.R., Holler, C.J., Webb, R.L., Li, F., Beckett, T.L., and Murphy, M.P. (2010). BACE1 and BACE2 enzymatic activities in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 112, 1045–1053.
- Aïd, S., Vancassel, S., Poumès-Ballihaut, C., Chalon, S., Guesnet, P., and Lavialle, M. (2003). Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. *J. Lipid Res.* 44, 1545–1551.
- Aïd, S., Vancassel, S., Linard, A., Lavialle, M., and Guesnet, P. (2005). Dietary docosahexaenoic acid [22: 6(n-3)] as a phospholipid or a triglyceride enhances the potassium chloride-evoked release of acetylcholine in rat hippocampus. *J. Nutr.* 135, 1008–1013.
- Aisen, P.S., Schmeidler, J., and Pasinetti, G.M. (2002). Randomized pilot study of nimesulide treatment in Alzheimer's disease. *Neurology* 58, 1050–1054.
- Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Godbout, S., and Valéro, J.R. (2011). Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Crit. Rev. Biotechnol.* 31, 227–249.
- Akbar, M., Calderon, F., Wen, Z., and Kim, H.-Y. (2005). Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 10858–10863.
- Akbaraly, T.N., Portet, F., Fustinoni, S., Dartigues, J.-F., Artero, S., Rouaud, O., Touchon, J., Ritchie, K., and Berr, C. (2009). Leisure activities and the risk of dementia in the elderly: results from the Three-City Study. *Neurology* 73, 854–861.
- Albanese, E., Dangour, A.D., Uauy, R., Acosta, D., Guerra, M., Guerra, S.S.G., Huang, Y., Jacob, K.S., de Rodriguez, J.L., Noriega, L.H., et al. (2009). Dietary fish and meat intake and dementia in Latin America, China, and India: a 10/66 Dementia Research Group population-based study. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 392–400.
- Alessandri, J.-M., Guesnet, P., Vancassel, S., Astorg, P., Denis, I., Langelier, B., Aïd, S., Poumès-Ballihaut, C., Champeil-Potokar, G., and Lavialle, M. (2004). Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 509–538.
- Al-Gayyar, M.M.H., Shams, M.E.E., and Barakat, E.A.M.E. (2012). Fish oil improves lipid metabolism and ameliorates inflammation in patients with metabolic syndrome: impact of nonalcoholic fatty liver disease. *Pharm Biol* 50, 297–303.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N., and Murtagh, F.R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Clin Anat* 8, 429–431.
- Amtul, Z., Keet, M., Wang, L., Merrifield, P., Westaway, D., and Rozmahel, R.F. (2011a). DHA supplemented in peptamen diet offers no advantage in pathways to amyloidosis: is it time to evaluate composite lipid diet? *PLoS ONE* 6, e24094.
- Amtul, Z., Uhrig, M., Rozmahel, R.F., and Beyreuther, K. (2011b). Structural insight into the differential effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on the production of A β peptides and amyloid plaques. *J Biol Chem* 286, 6100–6107.
- Andersen, K., Launer, L.J., Dewey, M.E., Letenneur, L., Ott, A., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Kragh-Sorensen, P., Baldereschi, M., Brayne, C., et al. (1999). Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology* 53, 1992–1997.
- Andreasen, N., Minthon, L., Davidsson, P., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Winblad, B., and Blennow, K. (2001). Evaluation of CSF-tau and CSF-A β 42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch. Neurol.* 58, 373–379.
- Andriollo-Sanchez, M., Hininger-Favier, I., Meunier, N., Venneria, E., O'Connor, J.M., Maiani, G., Coudray, C., and Roussel, A.M. (2005). Age-related oxidative stress and antioxidant parameters in middle-aged and older European subjects: the ZENITH study. *Eur J Clin Nutr* 59 Suppl 2, S58–62.
- Anstey, K.J., Cherbuin, N., Budge, M., and Young, J. (2011). Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obesity Reviews* 12, e426–e437.
- Arab, K., Rossary, A., Flourié, F., Tourneur, Y., and Steghens, J.-P. (2006). Docosahexaenoic acid enhances the antioxidant response of human fibroblasts by upregulating gamma-glutamyl-cysteine ligase and glutathione reductase. *Br. J. Nutr.* 95, 18–26.
- Araki, W., Kitaguchi, N., Tokushima, Y., Ishii, K., Aratake, H., Shimohama, S., Nakamura, S., and Kimura, J. (1991). Trophic effect of beta-amyloid precursor protein on cerebral cortical neurons in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 265–271.
- Araki, S., Nishio, Y., Araki, A., Umegaki, H., Sakurai, T., Iimuro, S., Ohashi, Y., Uzu, T., Maegawa, H., Kashiwagi, A., et al. (2012). Factors associated with progression of diabetic nephropathy in Japanese elderly patients with type 2 diabetes: Sub-analysis of the Japanese Elderly Diabetes Intervention Trial. *Geriatrics Gerontol Int.* 12, 127–133.
- Area-Gomez, E., de Groof, A.J.C., Boldogh, I., Bird, T.D., Gibson, G.E., Koehler, C.M., Yu, W.H., Duff, K.E., Yaffe, M.P., Pon, L.A., et al. (2009). Presenilins are enriched in endoplasmic reticulum membranes associated with mitochondria. *Am. J. Pathol.* 175, 1810–1816.
- Arendt, T., Schindler, C., Brückner, M.K., Eschrich, K., Bigl, V., Zedlick, D., and Marcova, L. (1997). Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein epsilon 4 allele. *J. Neurosci.* 17, 516–529.
- Arterburn, L.M., Hall, E.B., and Oken, H. (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 1467S–1476S.
- Arvanitakis, Z., Schneider, J.A., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Kelly, J.F., Evans, D.A., and Bennett, D.A. (2008). Statins, incident Alzheimer disease, change in cognitive function, and

neuropathology. *Neurology* 70, 1795–1802.

Asai, M., Hattori, C., Szabó, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., and Ishiura, S. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 231–235.

Ashokkumar, P., and Sudhandiran, G. (2008). Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomed. Pharmacother.* 62, 590–597.

Astorg, P., Arnault, N., Czernichow, S., Noisette, N., Galan, P., and Hercberg, S. (2004). Dietary intakes and food sources of n-6 and n-3 PUFA in French adult men and women. *Lipids* 39, 527–535.

Attems, J., Quass, M., Jellinger, K.A., and Lintner, F. (2007). Topographical distribution of cerebral amyloid angiopathy and its effect on cognitive decline are influenced by Alzheimer disease pathology. *J. Neurol. Sci.* 257, 49–55.

Atti, A.R., Palmer, K., Volpato, S., Winblad, B., De Ronchi, D., and Fratiglioni, L. (2008). Late-life body mass index and dementia incidence: nine-year follow-up data from the Kungsholmen Project. *J Am Geriatr Soc* 56, 111–116.

Babin, F., Abderrazik, M., Favier, F., Cristol, J.P., Léger, C.L., Papoz, L., and Descomps, B. (1999). Differences between polyunsaturated fatty acid status of non-institutionalised elderly women and younger controls: a bioconversion defect can be suspected. *Eur J Clin Nutr* 53, 591–596.

Bailey, J.A., and Lahiri, D.K. (2006). Neuronal differentiation is accompanied by increased levels of SNAP25 protein in fetal rat primary cortical neurons: implications in neuronal plasticity and Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1086, 54–65.

Balasubramanian, N., Scott, D.W., Castle, J.D., Casanova, J.E., and Schwartz, M.A. (2007). Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nat. Cell Biol.* 9, 1381–1391.

Balk, E., Chung, M., Lichtenstein, A., Chew, P., Kupelnick, B., Lawrence, A., DeVine, D., and Lau, J. (2004). Effects of omega-3 fatty acids on cardiovascular risk factors and intermediate markers of cardiovascular disease. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* 1–6.

Balk, E.M., Lichtenstein, A.H., Chung, M., Kupelnick, B., Chew, P., and Lau, J. (2006). Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. *Atherosclerosis* 189, 19–30.

Ball, K., Berch, D.B., Helmers, K.F., Jobe, J.B., Leveck, M.D., Marsiske, M., Morris, J.N., Rebok, G.W., Smith, D.M., Tennstedt, S.L., et al. (2002). Effects of cognitive training interventions with older adults: a randomized controlled trial. *JAMA* 288, 2271–2281.

Bamia, C., Orfanos, P., Ferrari, P., Overvad, K., Hundborg, H.H., Tjønneland, A., Olsen, A., Kesse, E., Boutron-Ruault, M.-C., Clavel-Chapelon, F., et al. (2005). Dietary patterns among older Europeans: the EPIC-Elderly study. *Br. J. Nutr.* 94, 100–113.

Barberger-Gateau, P., Letenneur, L., Deschamps, V., Pérès, K., Dartigues, J.-F., and Renaud, S. (2002). Fish, meat, and risk of dementia: cohort study. *BMJ* 325, 932–933.

Barberger-Gateau, P., Jutand, M.A., Letenneur, L., Larrieu, S., Tavernier, B., and Berr, C. (2005). Correlates of regular fish consumption in French elderly community dwellers: data from the Three-City study. *Eur J Clin Nutr* 59, 817–825.

Barberger-Gateau, P., Raffaitin, C., Letenneur, L., Berr, C., Tzourio, C., Dartigues, J.F., and Alperovitch, A. (2007). Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study. *Neurology* 69, 1921–1930.

Barberger-Gateau, P., Samieri, C., Féart, C., and Plourde, M. (2011). Dietary omega 3 polyunsaturated fatty acids and Alzheimer's disease: interaction with apolipoprotein E genotype. *Curr Alzheimer Res.* 8, 479–491.

Barelli, H., Lebeau, A., Vizzavona, J., Delaere, P., Chevallier, N., Drouot, C., Marambaud, P., Ancolio, K., Buxbaum, J.D., Khorkova, O., et al. (1997). Characterization of new polyclonal antibodies specific for 40 and 42 amino acid-long amyloid beta peptides: their use to examine the cell biology of presenilins and the immunohistochemistry of sporadic Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy cases. *Mol. Med.* 3, 695–707.

Barghorn, S., and Mandelkow, E. (2002). Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 41, 14885–14896.

Bazan, N.G. (2009). Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81, 205–211.

Beaufrère, B., and Morio, B. (2000). Fat and protein redistribution with aging: metabolic considerations. *Eur J Clin Nutr* 54 Suppl 3, S48–53.

Beckermann, B., Beneke, M., and Seitz, I. (1990). [Comparative bioavailability of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from triglycerides, free fatty acids and ethyl esters in volunteers]. *Arzneimittelforschung* 40, 700–704.

Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78, 547–581.

Begni, B., Brighina, L., Sirtori, E., Fumagalli, L., Andreoni, S., Beretta, S., Oster, T., Malaplate-Armand, C., Isella, V., Appollonio, I., et al. (2004). Oxidative stress impairs glutamate uptake in fibroblasts from patients with Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 892–901.

Beltz, B.S., Thust, M.F., Benton, J.L., and Sandeman, D.C. (2007). Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis. *Neurosci. Lett.* 415, 154–158.

Benedict, C., Jacobsson, J.A., Rönnekaa, E., Sällman-Almén, M., Brooks, S., Schultes, B., Fredriksson, R., Lannfelt, L., Kilander, L., and Schiöth, H.B. (2011). The fat mass and obesity gene is linked to reduced verbal fluency in overweight and obese elderly men. *Neurobiology of Aging* 32, 1159.e1–1159.e5.

Bensemam, F., Hot, D., Ferreira, S., Dumont, J., Bombois, S., Muraige, C.-A., Huot, L., Hermant, X., Levillain, E., Hubans, C., et al. (2009). Evidence for induction of the ornithine transcarbamylase expression in Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* 14, 106–116.

Berger, A., Mutch, D.M., German, J.B., and Roberts, M.A. (2002). Dietary effects of arachidonate-rich fungal oil and fish oil on murine hepatic and hippocampal gene expression. *Lipids Health Dis* 1, 2.

Beydoun, M.A., Kaufman, J.S., Satia, J.A., Rosamond, W., and Folsom, A.R. (2007). Plasma n-3 fatty acids and the risk of cognitive decline in older adults: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 1103–1111.

Beydoun, M.A., Kaufman, J.S., Sloane, P.D., Heiss, G., and Ibrahim, J. (2008). n-3 Fatty acids, hypertension and risk of cognitive decline among older adults in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Public Health Nutr* 11, 17–29.

Bhatia, H.S., Agrawal, R., Sharma, S., Huo, Y.-X., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2011). Omega-3 fatty acid deficiency during brain maturation reduces neuronal and behavioral plasticity in adulthood. *PLoS ONE* 6, e28451.

Biessels, G.J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C., and Scheltens, P. (2006). Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 5, 64–74.

Biranowska, J., Dziewiatkowski, J., Ludkiewicz, B., and Morys, J. (2002). Developmental changes of synaptic proteins expression within the hippocampal formation of the rat. *Anat. Embryol.* 206, 85–96.

- Bishop, N.A., Lu, T., and Yankner, B.A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* 464, 529–535.
- Bitan, G., Vollers, S.S., and Teplow, D.B. (2003). Elucidation of primary structure elements controlling early amyloid beta-protein oligomerization. *J. Biol. Chem.* 278, 34882–34889.
- Bizon, J.L., and Gallagher, M. (2003). Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur. J. Neurosci.* 18, 215–219.
- Björkhem, I. (2006). Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J. Intern. Med.* 260, 493–508.
- Björkhem, I., Lütjohann, D., Breuer, O., Sakinis, A., and Wennmalm, A. (1997). Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with 18O techniques in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 272, 30178–30184.
- Blennow, K., and Hampel, H. (2003). CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2, 605–613.
- Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., and Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6, 131–144.
- Blennow, K., Zetterberg, H., and Fagan, A.M. (2012). Fluid biomarkers in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.
- Blondeau, N., Nguemeni, C., Debruyne, D.N., Piens, M., Wu, X., Pan, H., Hu, X., Gandin, C., Lipsky, R.H., Plumier, J.-C., et al. (2009). Subchronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: a versatile potential therapy for stroke. *Neuropsychopharmacology* 34, 2548–2559.
- Boettler, U., Sommerfeld, K., Volz, N., Pahlke, G., Teller, N., Somoza, V., Lang, R., Hofmann, T., and Marko, D. (2011). Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. *J. Nutr. Biochem.* 22, 426–440.
- Boix, J., Cauli, O., and Felipo, V. (2010). Developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 affects differentially learning or motor coordination in adult rats. Mechanisms involved. *Neuroscience* 167, 994–1003.
- Boix, J., Cauli, O., Leslie, H., and Felipo, V. (2011). Differential long-term effects of developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 on motor activity and neurotransmission. Gender dependence and mechanisms involved. *Neurochem. Int.* 58, 69–77.
- Bolton-Smith, C., Woodward, M., and Tavendale, R. (1997). Evidence for age-related differences in the fatty acid composition of human adipose tissue, independent of diet. *Eur J Clin Nutr* 51, 619–624.
- Boneva, N.B., Kikuchi, M., Minabe, Y., and Yamashima, T. (2011). Neuroprotective and ameliorative actions of polyunsaturated fatty acids against neuronal diseases: implication of fatty acid-binding proteins (FABP) and G protein-coupled receptor 40 (GPR40) in adult neurogenesis. *J. Pharmacol. Sci.* 116, 163–172.
- Borgwardt, S., Hammann, F., Scheffler, K., Kreuter, M., Drewe, J., and Beglinger, C. (2012). Neural effects of green tea extract on dorsolateral prefrontal cortex. *Eur J Clin Nutr.*
- Borthwick, L. (1998). The effects of an omega-3 ethyl ester concentrate on blood lipid concentrations in patients with hyperlipidaemia. *Clin Drug Investig* 15, 397–404.
- Boston, P.F., Bennett, A., Horrobin, D.F., and Bennett, C.N. (2004). Ethyl-EPA in Alzheimer's disease—a pilot study. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 71, 341–346.
- Boulton, D.W., Walle, U.K., and Walle, T. (1998). Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J. Pharm. Pharmacol.* 50, 243–249.
- el Boustani, S., Colette, C., Monnier, L., Descomps, B., Crastes de Paulet, A., and Mendy, F. (1987). Enteral absorption in man of eicosapentaenoic acid in different chemical forms. *Lipids* 22, 711–714.
- Bouteloup, C., and Ferrier, A. (2011). Nutrition et accident vasculaire cérébral. *Nutrition Clinique Et Métabolisme* 25, 217–226.
- Bouwens, M., van de Rest, O., Dellschaft, N., Bromhaar, M.G., de Groot, L.C.P.G.M., Geleijnse, J.M., Müller, M., and Afman, L.A. (2009). Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 415–424.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239–259.
- Braak, H., and Braak, E. (1992). The human entorhinal cortex: normal morphology and lamina-specific pathology in various diseases. *Neurosci. Res.* 15, 6–31.
- Brand, A., Schonfeld, E., Isharel, I., and Yavin, E. (2008). Docosahexaenoic acid-dependent iron accumulation in oligodendroglia cells protects from hydrogen peroxide-induced damage. *J. Neurochem.* 105, 1325–1335.
- Brenna, J.T. (2011) Animal studies of the functional consequences of suboptimal polyunsaturated fatty acid status during pregnancy, lactation and early post-natal life. *Matern Child Nutr.* 7 Suppl 2, 59-79.
- Brown, D.A., and London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275, 17221–17224.
- Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2009). Advances in Tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat Rev Drug Discov* 8, 783–793.
- Brunelli, L., Llansola, M., Felipo, V., Campagna, R., Airoidi, L., De Paola, M., Fanelli, R., Mariani, A., Mazzeo, M., and Pastorelli, R. (2012). Insight into the neuroproteomics effects of the food-contaminant non-dioxin like polychlorinated biphenyls. *J Proteomics* 75, 2417–2430.
- Brunholz, S., Sisodia, S., Lorenzo, A., Deyts, C., Kins, S., and Morfini, G. (2012). Axonal transport of APP and the spatial regulation of APP cleavage and function in neuronal cells. *Exp Brain Res* 217, 353–364.
- Brunk, U.T., and Terman, A. (2002). Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 611–619.
- Buchman, A.S., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Shah, R.C., Evans, D.A., and Bennett, D.A. (2005). Change in body mass index and risk of incident Alzheimer disease. *Neurology* 65, 892–897.
- Buchman, A.S., Boyle, P.A., Yu, L., Shah, R.C., Wilson, R.S., and Bennett, D.A. (2012). Total daily physical activity and the risk of AD and cognitive decline in older adults. *Neurology* 78, 1323–1329.
- Buée, L., and Delacourte, A. (2006). [Tauopathy and Alzheimer disease: a full degenerating process]. *Psychol Neuropsychiatr Vieil* 4, 261–273.
- Buffa, R., Floris, G.U., Putzu, P.F., and Marini, E. (2011). Body composition variations in ageing. *Coll Antropol* 35, 259–265.
- Burke, S.N., and Barnes, C.A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 30–40.
- Burns, M., and Duff, K. (2002). Cholesterol in Alzheimer's disease and tauopathy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 977, 367–375.
- Busche, M.A., Eichhoff, G., Adelsberger, H., Abramowski, D., Wiederhold, K.-H., Haass, C., Staufenbiel, M., Konnerth, A., and Garaschuk, O. (2008). Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 321, 1686–1689.

- Caccamo, A., Oddo, S., Sugarman, M.C., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2005). Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders. *Neurobiol. Aging* 26, 645–654.
- Cacchione, P.Z., Powlishta, K.K., Grant, E.A., Buckles, V.D., and Morris, J.C. (2003). Accuracy of collateral source reports in very mild to mild dementia of the Alzheimer type. *J Am Geriatr Soc* 51, 819–823.
- Cacquevel, M., Aeschbach, L., Houacine, J., and Fraering, P.C. (2012). Alzheimer's disease-linked mutations in presenilin-1 result in a drastic loss of activity in purified γ -secretase complexes. *PLoS ONE* 7, e35133.
- Cadenas, E., and Davies, K.J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222–230.
- Caillé, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U., and Prochiantz, A. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development* 131, 2173–2181.
- Calder, P.C. (2004). n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin. Sci.* 107, 1–11.
- Calder, P.C. (2006). n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 1505S–1519S.
- Calderon, F., and Kim, H.-Y. (2004). Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 90, 979–988.
- Calon, F., and Cole, G. (2007). Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 77, 287–293.
- Calon, F., Lim, G.P., Yang, F., Morihara, T., Teter, B., Ubeda, O., Rostaing, P., Triller, A., Salem, N., Jr, Ashe, K.H., et al. (2004). Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* 43, 633–645.
- Campoy, C., Escolano-Margarit, M.V., Anjos, T., Szajewska, H., and Uauy, R. (2012). Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. *Br J Nutr.* 107 Suppl 2, S85–106.
- Canas, P.M., Porciúncula, L.O., Cunha, G.M.A., Silva, C.G., Machado, N.J., Oliveira, J.M.A., Oliveira, C.R., and Cunha, R.A. (2009). Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci.* 29, 14741–14751.
- Cao, X., and Südhof, T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115–120.
- Cao, D., Xue, R., Xu, J., and Liu, Z. (2005). Effects of docosahexaenoic acid on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures. *J. Nutr. Biochem.* 16, 538–546.
- Cao, D., Kevala, K., Kim, J., Moon, H.-S., Jun, S.B., Lovinger, D., and Kim, H.-Y. (2009). Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J. Neurochem.* 111, 510–521.
- Capell, A., Beher, D., Prokop, S., Steiner, H., Kaether, C., Shearman, M.S., and Haass, C. (2005). Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 6471–6478.
- Carepeiro, M.M., Rogero, M.M., Bertolami, M.C., Botelho, P.B., Castro, N., and Castro, I.A. (2011). Effect of n-3 fatty acids and statins on oxidative stress in statin-treated hypercholesterolemic and normocholesterolemic women. *Atherosclerosis* 217, 171–178.
- Castellano, J.M., Kim, J., Stewart, F.R., Jiang, H., DeMattos, R.B., Patterson, B.W., Fagan, A.M., Morris, J.C., Mawuenyega, K.G., Cruchaga, C., et al. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci Transl Med* 3, 89ra57.
- Cataldo, J.K., Prochaska, J.J., and Glantz, S.A. (2010). Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's Disease: an analysis controlling for tobacco industry affiliation. *J. Alzheimers Dis.* 19, 465–480.
- Chalon, S. (2006). Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 75, 259–269.
- Chandola, T., Ferrie, J., Sacker, A., and Marmot, M. (2007). Social inequalities in self reported health in early old age: follow-up of prospective cohort study. *BMJ* 334, 990.
- Chang, A.M., and Halter, J.B. (2003). Aging and insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, E7–12.
- Chapkin, R.S., Wang, N., Fan, Y.-Y., Lupton, J.R., and Prior, I.A. (2008). Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 466–471.
- Chapman, I.M., MacIntosh, C.G., Morley, J.E., and Horowitz, M. (2002). The anorexia of ageing. *Biogerontology* 3, 67–71.
- Chasseigneaux S, Allinquant B. (2012) Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *J. Neurochem.* 120 Suppl 1, 99-108.
- Chávez-Gutiérrez, L., Bammens, L., Benilova, I., Vandersteen, A., Benurwar, M., Borgers, M., Lismont, S., Zhou, L., Van Cleynenbreugel, S., Esselmann, H., et al. (2012). The mechanism of γ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J.* 31, 2261–2274.
- Chen, K.-P., and Dou, F. (2012). Selective interaction of amyloid precursor protein with different isoforms of neural cell adhesion molecule. *J. Mol. Neurosci.* 46, 203–209.
- Chen, C.T., Green, J.T., Orr, S.K., and Bazinet, R.P. (2008). Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 79, 85–91.
- Chen, Y.-K., Cheung, C., Reuhl, K.R., Liu, A.B., Lee, M.-J., Lu, Y.-P., and Yang, C.S. (2011). Effects of Green Tea Polyphenol (–)Epigallocatechin-3-gallate on Newly Developed High-Fat/Western-Style Diet-Induced Obesity and Metabolic Syndrome in Mice. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11862–11871.
- Cherubini, A., Andres-Lacueva, C., Martin, A., Lauretani, F., Iorio, A.D., Bartali, B., Corsi, A., Bandinelli, S., Mattson, M.P., and Ferrucci, L. (2007). Low plasma N-3 fatty acids and dementia in older persons: the InCHIANTI study. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 62, 1120–1126.
- Childs, C.E., Romijn, T., Enke, U., Hoile, S., and Calder, P.C. (2010). Maternal diet during pregnancy has tissue-specific effects upon fetal fatty acid composition and alters fetal immune parameters. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 83, 179–184.
- Chiu, C.-C., Su, K.-P., Cheng, T.-C., Liu, H.-C., Chang, C.-J., Dewey, M.E., Stewart, R., and Huang, S.-Y. (2008). The effects of omega-3 fatty acids monotherapy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a preliminary randomized double-blind placebo-controlled study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32, 1538–1544.
- Chong, M.S., and Sahadevan, S. (2005). Preclinical Alzheimer's disease: diagnosis and prediction of progression. *Lancet Neurol* 4, 576–579.
- Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 621S–629S.
- Chung, H., Nettleton, J.A., Lemaitre, R.N., Barr, R.G., Tsai, M.Y., Tracy, R.P., and Siscovick, D.S. (2008a). Frequency and type of seafood consumed influence plasma (n-3) fatty acid concentrations. *J. Nutr.* 138, 2422–2427.

- Chung, W.-L., Chen, J.-J., and Su, H.-M. (2008b). Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficient male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels. *J. Nutr.* *138*, 1165–1171.
- Churchill, J.D., Galvez, R., Colcombe, S., Swain, R.A., Kramer, A.F., and Greenough, W.T. (2002). Exercise, experience and the aging brain. *Neurobiol. Aging* *23*, 941–955.
- Cole, G.M., Lim, G.P., Yang, F., Teter, B., Begum, A., Ma, Q., Harris-White, M.E., and Frautschy, S.A. (2005). Prevention of Alzheimer's disease: Omega-3 fatty acid and phenolic antioxidant interventions. *Neurobiology of Aging* *26*, 133–136.
- Cnop, M., Igoillo-Esteve, M., Hughes, S.J., Walker, J.N., Cnop, I., and Clark, A. (2011). Longevity of human islet α - and β -cells. *Diabetes Obes Metab* *13 Suppl 1*, 39–46.
- Cochran, E., Bacci, B., Chen, Y., Patton, A., Gambetti, P., and Auttilio-Gambetti, L. (1991). Amyloid precursor protein and ubiquitin immunoreactivity in dystrophic axons is not unique to Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* *139*, 485–489.
- Colliot, O., Chételat, G., Chupin, M., Desgranges, B., Magnin, B., Benali, H., Dubois, B., Garnero, L., Eustache, F., and Lehericy, S. (2008). Discrimination between Alzheimer disease, mild cognitive impairment, and normal aging by using automated segmentation of the hippocampus. *Radiology* *248*, 194–201.
- Commenges, D., Scotet, V., Renaud, S., Jacqmin-Gadda, H., Barberger-Gateau, P., and Dartigues, J.F. (2000). Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur. J. Epidemiol.* *16*, 357–363.
- Connelly, S.J., Mukaetova-Ladinska, E.B., Abdul-All, Z., Alves da Silva, J., Brayne, C., Honer, W.G., and Mann, D.M.A. (2011). Synaptic changes in frontotemporal lobar degeneration: correlation with MAPT haplotype and APOE genotype. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *37*, 366–380.
- Connor, W.E., Neuringer, M., and Lin, D.S. (1990). Dietary effects on brain fatty acid composition: the reversibility of n-3 fatty acid deficiency and turnover of docosahexaenoic acid in the brain, erythrocytes, and plasma of rhesus monkeys. *J. Lipid Res.* *31*, 237–247.
- Conquer, J.A., Tierney, M.C., Zecevic, J., Bettger, W.J., and Fisher, R.H. (2000). Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids* *35*, 1305–1312.
- Cook, D.G., Leverenz, J.B., McMillan, P.J., Kulstad, J.J., Ericksen, S., Roth, R.A., Schellenberg, G.D., Jin, L.-W., Kovacina, K.S., and Craft, S. (2003). Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am. J. Pathol.* *162*, 313–319.
- Corder, E.H., Ghebremedhin, E., Taylor, M.G., Thal, D.R., Ohm, T.G., and Braak, H. (2004). The biphasic relationship between regional brain senile plaque and neurofibrillary tangle distributions: modification by age, sex, and APOE polymorphism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1019*, 24–28.
- Corona, G., Deiana, M., Incani, A., Vauzour, D., Dessì, M.A., and Spencer, J.P.E. (2007). Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *362*, 606–611.
- Corrigan, F.M., Horrobin, D.F., Skinner, E.R., Besson, J.A., and Cooper, M.B. (1998). Abnormal content of n-6 and n-3 long-chain unsaturated fatty acids in the phosphoglycerides and cholesterol esters of parahippocampal cortex from Alzheimer's disease patients and its relationship to acetyl CoA content. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *30*, 197–207.
- Corrigan, F., Pham, C.L.L., Vink, R., Blumbergs, P.C., Masters, C.L., van den Heuvel, C., and Cappai, R. (2011). The neuroprotective domains of the amyloid precursor protein, in traumatic brain injury, are located in the two growth factor domains. *Brain Res.* *1378*, 137–143.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., and Vanden Berghe, D. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* *61*, 71–76.
- Costa, R.O., Lacor, P.N., Ferreira, I.L., Resende, R., Auberson, Y.P., Klein, W.L., Oliveira, C.R., Rego, A.C., and Pereira, C.M.F. (2012). Endoplasmic reticulum stress occurs downstream of GluN2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptor in mature hippocampal cultures treated with amyloid- β oligomers. *Aging Cell.* *11*, 823–833.
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C., and Christie, L.-A. (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* *30*, 464–472.
- Coulson, E.J. (2006). Does the p75 neurotrophin receptor mediate Abeta-induced toxicity in Alzheimer's disease? *J. Neurochem.* *98*, 654–660.
- Covas, M.-I., Nyyssonen, K., Poulsen, H.E., Kaikkonen, J., Zunft, H.-J.F., Kiesewetter, H., Gaddi, A., de la Torre, R., Mursu, J., Baumler, H., et al. (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* *145*, 333–341.
- Cowan, C.M., Bossing, T., Page, A., Shepherd, D., and Mudher, A. (2010). Soluble hyper-phosphorylated tau causes microtubule breakdown and functionally compromises normal tau in vivo. *Acta Neuropathol.* *120*, 593–604.
- de Craen, A.J.M., Gussekloo, J., Vrijisen, B., and Westendorp, R.G.J. (2005). Meta-analysis of nonsteroidal antiinflammatory drug use and risk of dementia. *Am. J. Epidemiol.* *161*, 114–120.
- Cravedi, J.P., and Narbonne, J.F. (2002). Données récentes sur l'évaluation des dangers liés à la présence de PCB dans l'alimentation.
- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Cotelle, N., Vézina, H., Demigné, C., and Rémésy, C. (2003). The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *284*, G980–988.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., and Clifford, M.N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* *26*, 1001–1043.
- Cunnane, S.C., Francescutti, V., Brenna, J.T., and Crawford, M.A. (2000). Breast-fed infants achieve a higher rate of brain and whole body docosahexaenoate accumulation than formula-fed infants not consuming dietary docosahexaenoate. *Lipids* *35*, 105–111.
- Cunnane, S.C., Plourde, M., Stewart, K., and Crawford, M.A. (2007). Docosahexaenoic acid and shore-based diets in hominin encephalization: a rebuttal. *Am J Hum Biol.* *19*, 578–581.
- Cunnane, S.C., Plourde, M., Pifferi, F., Bégin, M., Féart, C., and Barberger-Gateau, P. (2009). Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Prog. Lipid Res.* *48*, 239–256.
- Cunnane, S.C., Chouinard-Watkins, R., Castellano, C.A., and Barberger-Gateau, P. (2012). Docosahexaenoic acid homeostasis, brain aging and Alzheimer's disease: Can we reconcile the evidence? Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. doi:10.1016/j.plefa.2012.04.006
- Curtin, J.F., Donovan, M., and Cotter, T.G. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods* *265*, 49–72.
- Cutler, R.G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W.A., Tammara,

- A., Hatanpaa, K., Troncoso, J.C., and Mattson, M.P. (2004). Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 2070–2075.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., and Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanita* *43*, 348–361.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., and Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int J Mol Sci* *11*, 1321–1342.
- Dahl, L., Møland, C.A., and Bjørkkjær, T. (2011). A short food frequency questionnaire to assess intake of seafood and n-3 supplements: validation with biomarkers. *Nutr J* *10*, 127.
- Damasceno, N.R.T., Pérez-Heras, A., Serra, M., Cofán, M., Sala-Vila, A., Salas-Salvadó, J., and Ros, E. (2011). Crossover study of diets enriched with virgin olive oil, walnuts or almonds. Effects on lipids and other cardiovascular risk markers. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* *21*, S14–S20.
- Dangles, O., Dufour, C., and Bret, S. (1999). Flavonol–serum albumin complexation. Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* *737–744*.
- Darras, V.M. (2008). Endocrine disrupting polyhalogenated organic pollutants interfere with thyroid hormone signalling in the developing brain. *Cerebellum* *7*, 26–37.
- Datla, K.P., Christidou, M., Widmer, W.W., Rooprai, H.K., and Dexter, D.T. (2001). Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport* *12*, 3871–3875.
- Davidson, M.H. (2006). Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *Am. J. Cardiol.* *98*, 27i–33i.
- Dawson, G.R., Seabrook, G.R., Zheng, H., Smith, D.W., Graham, S., O'Dowd, G., Bowery, B.J., Boyce, S., Trumbauer, M.E., Chen, H.Y., et al. (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* *90*, 1–13.
- Dawson, H.N., Ferreira, A., Eyster, M.V., Ghoshal, N., Binder, L.I., and Vitek, M.P. (2001). Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J. Cell. Sci.* *114*, 1179–1187.
- DeCarli, C., Massaro, J., Harvey, D., Hald, J., Tullberg, M., Au, R., Beiser, A., D'Agostino, R., and Wolf, P.A. (2005). Measures of brain morphology and infarction in the framingham heart study: establishing what is normal. *Neurobiol. Aging* *26*, 491–510.
- Decker, H., Jürgensen, S., Adrover, M.F., Brito-Moreira, J., Bomfim, T.R., Klein, W.L., Epstein, A.L., De Felice, F.G., Jerusalinsky, D., and Ferreira, S.T. (2010a). N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid- β peptide oligomers. *J. Neurochem.* *115*, 1520–1529.
- Decker, H., Lo, K.Y., Unger, S.M., Ferreira, S.T., and Silverman, M.A. (2010b). Amyloid-beta peptide oligomers disrupt axonal transport through an NMDA receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3beta in primary cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* *30*, 9166–9171.
- DeFronzo, R.A. (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med. Clin. North Am.* *88*, 787–835, ix.
- Delacourte, A. (1998). [Diagnosis of Alzheimer's disease]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* *56*, 133–142.
- Delaère, P., He, Y., Fayet, G., Duyckaerts, C., and Hauw, J.J. (1993). Beta A4 deposits are constant in the brain of the oldest old: an immunocytochemical study of 20 French centenarians. *Neurobiol. Aging* *14*, 191–194.
- DeMar, J.C., Jr, Ma, K., Bell, J.M., and Rapoport, S.I. (2004). Half-lives of docosahexaenoic acid in rat brain phospholipids are prolonged by 15 weeks of nutritional deprivation of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Neurochem.* *91*, 1125–1137.
- Demars, M.P., Bartholomew, A., Strakova, Z., and Lazarov, O. (2011). Soluble amyloid precursor protein: a novel proliferation factor of adult progenitor cells of ectodermal and mesodermal origin. *Stem Cell Res Ther* *2*, 36.
- Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S.C., Parker, I., and Glabe, C.G. (2005). Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* *280*, 17294–17300.
- Denison, H.J., Jameson, K.A., Syddall, H.E., Dennison, E.M., Cooper, C., Sayer, A.A., and Robinson, S.M. (2012). Patterns of dietary supplement use among older men and women in the UK: findings from the Hertfordshire Cohort Study. *J Nutr Health Aging* *16*, 307–311.
- Desai, A.K., and Grossberg, G.T. (2005). Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Neurology Neurologic Disorders Update: Current Thinking and Practices* *64*.
- Desbène, C., Malaplate-Armand, C., Youssef, I., Garcia, P., Stenger, C., Sauvée, M., Fischer, N., Rimet, D., Koziel, V., Escanyé, M.-C., et al. (2012). Critical role of cPLA(2) in A β oligomer-induced neurodegeneration and memory deficit. *Neurobiol. Aging* *33*, 1123.e17–29.
- Devore, E.E., Grodstein, F., van Rooij, F.J.A., Hofman, A., Rosner, B., Stampfer, M.J., Witteman, J.C.M., and Breteler, M.M.B. (2009). Dietary intake of fish and omega-3 fatty acids in relation to long-term dementia risk. *Am. J. Clin. Nutr.* *90*, 170–176.
- Devore, E.E., Kang, J.H., Breteler, M.M.B., and Grodstein, F. (2012). Dietary intakes of berries and flavonoids in relation to cognitive decline. *Ann. Neurol.* *72*, 135–143.
- Dhenain, M., Lehericy, S., and Duyckaerts, C. (2002). Le diagnostic : de la neuropathologie à l'imagerie cérébrale. *Médecine/sciences* *18*, 697–708.
- Dickinson, H.O., Mason, J.M., Nicolson, D.J., Campbell, F., Beyer, F.R., Cook, J.V., Williams, B., and Ford, G.A. (2006). Lifestyle interventions to reduce raised blood pressure: a systematic review of randomized controlled trials. *J. Hypertens.* *24*, 215–233.
- Dickstein, D.L., Kabaso, D., Rocher, A.B., Luebke, J.I., Wearne, S.L., and Hof, P.R. (2007). Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell* *6*, 275–284.
- Dodart, J.-C., Bales, K.R., Gannon, K.S., Greene, S.J., DeMattos, R.B., Mathis, C., DeLong, C.A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D.M., et al. (2002). Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat. Neurosci.* *5*, 452–457.
- Drapeau, E., and Nora Abrous, D. (2008). Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell* *7*, 569–589.
- Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., and Kirschner, M.W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell* *3*, 1141–1154.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* *82*, 47–95.
- Drouet, B., Pinçon-Raymond, M., Chambaz, J., and Pillot, T. (2000). Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* *57*, 705–715.
- Du, J., Zhang, L., Liu, S., and Wang, Z. (2010). Palmitic acid and docosahexaenoic acid opposingly regulate the expression of insulin-degrading enzyme in neurons. *Pharmazie* *65*, 231–232.

- Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Dekosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., et al. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6, 734–746.
- Dubois, B., Picard, G., and Sarazin, M. (2009). Early detection of Alzheimer's disease: new diagnostic criteria. *Dialogues Clin Neurosci* 11, 135–139.
- Dullemeijer, C., Durga, J., Brouwer, I.A., van de Rest, O., Kok, F.J., Brummer, R.-J.M., van Boxtel, M.P., and Verhoef, P. (2007). n 3 fatty acid proportions in plasma and cognitive performance in older adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 86, 1479–1485.
- Dumitriu, D., Hao, J., Hara, Y., Kaufmann, J., Janssen, W.G.M., Lou, W., Rapp, P.R., and Morrison, J.H. (2010). Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment. *J. Neurosci.* 30, 7507–7515.
- Duracková, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 59, 459–469.
- Duyckaerts, C., Hauw, J.J., Bastenaire, F., Piette, F., Poulain, C., Rainsard, V., Javoy-Agid, F., and Berthaux, P. (1986). Laminar distribution of neocortical senile plaques in senile dementia of the Alzheimer type. *Acta Neuropathol.* 70, 249–256.
- Duyckaerts, C., Delatour, B., and Potier, M.-C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 118, 5–36.
- Dyall, S.C., and Michael-Titus, A.T. (2008). Neurological benefits of omega-3 fatty acids. *Neuromolecular Med.* 10, 219–235.
- Dyer, C.A., and Sinclair, A.J. (1998). The premature ageing syndromes: insights into the ageing process. *Age Ageing* 27, 73–80.
- Dyerberg, J., Madsen, P., Møller, J.M., Aardestrup, I., and Schmidt, E.B. (2010). Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 83, 137–141.
- Eckman, E.A., Reed, D.K., and Eckman, C.B. (2001). Degradation of the Alzheimer's Amyloid β Peptide by Endothelin-converting Enzyme. *J. Biol. Chem.* 276, 24540–24548.
- Eckman, E.A., Watson, M., Marlow, L., Sambamurti, K., and Eckman, C.B. (2003). Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 278, 2081–2084.
- Edeas, M., Attaf, D., Mailfert, A.-S., Nasu, M., and Joubet, R. (2010). Maillard reaction, mitochondria and oxidative stress: potential role of antioxidants. *Pathol. Biol.* 58, 220–225.
- Egert, S., Kannenberg, F., Somoza, V., Erbersdobler, H.F., and Wahrburg, U. (2009). Dietary α -Linolenic Acid, EPA, and DHA Have Differential Effects on LDL Fatty Acid Composition but Similar Effects on Serum Lipid Profiles in Normolipidemic Humans. *J. Nutr.* 139, 861–868.
- Eggers, C., Herholz, K., Kalbe, E., and Heiss, W.-D. (2006). Cortical acetylcholine esterase activity and ApoE4-genotype in Alzheimer disease. *Neurosci. Lett.* 408, 46–50.
- Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., and Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* 160, 113–123.
- Ehrhofer, D.E., Bieschke, J., Boeddrich, A., Herbst, M., Masino, L., Lurz, R., Engemann, S., Pastore, A., and Wanker, E.E. (2008). EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 558–566.
- Elias, M.F., Wolf, P.A., D'Agostino, R.B., Cobb, J., and White, L.R. (1993). Untreated blood pressure level is inversely related to cognitive functioning: the Framingham Study. *Am. J. Epidemiol.* 138, 353–364.
- Elmadfa, I., and Meyer, A.L. (2008). Body composition, changing physiological functions and nutrient requirements of the elderly. *Ann. Nutr. Metab.* 52 Suppl 1, 2–5.
- Engelhart, M.J., Geerlings, M.I., Ruitenberg, A., Van Swieten, J.C., Hofman, A., Witterman, J.C.M., and Breteler, M.M.B. (2002). Diet and risk of dementia: Does fat matter?: The Rotterdam Study. *Neurology* 59, 1915–1921.
- Engvall, E., and Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871–874.
- Epis, R., Marcello, E., Gardoni, F., Vastagh, C., Malinverno, M., Balducci, C., Colombo, A., Borroni, B., Vara, H., Dell'Agli, M., et al. (2010). Blocking ADAM10 synaptic trafficking generates a model of sporadic Alzheimer's disease. *Brain* 133, 3323–3335.
- Erickson, K.I., Voss, M.W., Prakash, R.S., Basak, C., Szabo, A., Chaddock, L., Kim, J.S., Heo, S., Alves, H., White, S.M., et al. (2011). Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 3017–3022.
- Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P.J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122–1124.
- Eslick, G.D., Howe, P.R.C., Smith, C., Priest, R., and Bensoussan, A. (2009). Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cardiol.* 136, 4–16.
- Esselens, C., Sannerud, R., Gallardo, R., Baert, V., Kaden, D., Serneels, L., De Strooper, B., Rousseau, F., Multhaup, G., Schymkowitz, J., Langedijk, J.P., Annaert, W. (2012) Peptides based on the presenilin-APP binding domain inhibit APP processing and A β production through interfering with the APP transmembrane domain. *FASEB J.* 26, 3765–378.
- Estruch, R., Martínez-González, M.A., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Ruiz-Gutiérrez, V., Covas, M.I., Fiol, M., Gómez-Gracia, E., López-Sabater, M.C., Vinyoles, E., et al. (2006). Effects of a Mediterranean-Style Diet on Cardiovascular Risk Factors: A Randomized Trial. *Ann Intern Med* 145, 1–11.
- Fakhzadeh, H., Ghaderpanahi, M., Sharifi, F., Mirarefin, M., Badamchizade, Z., Kamrani, A.-A.A., and Larjani, B. (2010). The effects of low dose n-3 fatty acids on serum lipid profiles and insulin resistance of the elderly: a randomized controlled clinical trial. *Int J Vitam Nutr Res* 80, 107–116.
- Falkevall, A., Alikhani, N., Bhushan, S., Pavlov, P.F., Busch, K., Johnson, K.A., Eneqvist, T., Tjernberg, L., Ankarcrona, M., and Glaser, E. (2006). Degradation of the amyloid beta-protein by the novel mitochondrial peptidase, PreP. *J. Biol. Chem.* 281, 29096–29104.
- Fang, Y.-Z., Yang, S., and Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872–879.
- Farooqui, A.A., and Horrocks, L.A. (2004). Brain phospholipases A2: a perspective on the history. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 71, 161–169.
- Farooqui, A.A., Horrocks, L.A., and Farooqui, T. (2007). Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J. Neurochem.* 101, 577–599.
- Farquharson, J., Jamieson, E.C., Abbasi, K.A., Patrick, W.J., Logan, R.W., and Cockburn, F. (1995). Effect of diet on the fatty acid composition of the major phospholipids of infant cerebral cortex. *Arch. Dis. Child.* 72, 198–203.
- Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., and van Duijn, C.M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. *APOE and Alzheimer Disease Meta*

Analysis Consortium. *JAMA* 278, 1349–1356.

Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., et al. (2001). Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5856–5861.

Favrelière, S., Perault, M.C., Huguet, F., De Javel, D., Bertrand, N., Piriou, A., and Durand, G. (2003). DHA-enriched phospholipid diets modulate age-related alterations in rat hippocampus. *Neurobiol. Aging* 24, 233–243.

Féart, C., Jutand, M.A., Larrieu, S., Letenneur, L., Delcourt, C., Combe, N., and Barberger-Gateau, P. (2007). Energy, macronutrient and fatty acid intake of French elderly community dwellers and association with socio-demographic characteristics: data from the Bordeaux sample of the Three-City Study. *Br. J. Nutr.* 98, 1046–1057.

Féart, C., Torrès, M.J.M., Samieri, C., Jutand, M.-A., Peuchant, E., Simopoulos, A.P., and Barberger-Gateau, P. (2011). Adherence to a Mediterranean diet and plasma fatty acids: data from the Bordeaux sample of the Three-City study. *Br. J. Nutr.* 106, 149–158.

Fedorova, I., and Salem, N., Jr (2006). Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 75, 271–289.

Feldman, H.H., and Woodward, M. (2005). The staging and assessment of moderate to severe Alzheimer disease. *Neurology* 65, S10–S17.

De Felice, F.G., Velasco, P.T., Lambert, M.P., Viola, K., Fernandez, S.J., Ferreira, S.T., and Klein, W.L. (2007). Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J. Biol. Chem.* 282, 11590–11601.

Feller, S.E. (2008). Acyl chain conformations in phospholipid bilayers: a comparative study of docosahexaenoic acid and saturated fatty acids. *Chem. Phys. Lipids* 153, 76–80.

Ferreira, A., Caceres, A., and Kosik, K.S. (1993). Intraneuronal compartments of the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 13, 3112–3123.

Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., et al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112–2117.

Fifre, A., Sponne, I., Koziel, V., Kriem, B., Yen Potin, F.T., Bihain, B.E., Olivier, J.-L., Oster, T., and Pillot, T. (2006). Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid beta-peptide-induced neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3. *J. Biol. Chem.* 281, 229–240.

Filaire, E., Massart, A., Portier, H., Rouveix, M., Rosado, F., Bage, A.S., Gobert, M., and Durand, D. (2010). Effect of 6 Weeks of n-3 fatty-acid supplementation on oxidative stress in Judo athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 20, 496–506.

Finch, C.E., and Cohen, D.M. (1997). Aging, metabolism, and Alzheimer disease: review and hypotheses. *Exp. Neurol.* 143, 82–102.

Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.

Fitzgerald, E.F., Belanger, E.E., Gomez, M.I., Cayo, M., McCaffrey, R.J., Seegal, R.F., Jansing, R.L., Hwang, S., and Hicks, H.E. (2008). Polychlorinated biphenyl exposure and neuropsychological status among older residents of upper Hudson River communities. *Environ. Health Perspect.* 116, 209–215.

Fjell, A.M., Walhovd, K.B., Fennema-Notestine, C., McEvoy,

L.K., Hagler, D.J., Holland, D., Brewer, J.B., and Dale, A.M. (2009). One-year brain atrophy evident in healthy aging. *J. Neurosci.* 29, 15223–15231.

Fki, I., Sahnoun, Z., and Sayadi, S. (2007). Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. *J. Agric. Food Chem.* 55, 624–631.

Fleck, M.W., Barrionuevo, G., and Palmer, A.M. (2001). Synaptosomal and vesicular accumulation of L-glutamate, L-aspartate and D-aspartate. *Neurochem. Int.* 39, 217–225.

Flood, J.F., Morley, J.E., and Roberts, E. (1991). Amnestic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid beta protein from patients with Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3363–3366.

Florent, S., Malaplate-Armand, C., Youssef, I., Kriem, B., Koziel, V., Escanyé, M.-C., Fifre, A., Sponne, I., Leininger-Muller, B., Olivier, J.-L., et al. (2006). Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers. *J. Neurochem.* 96, 385–395.

Florent-Béchar, S., Malaplate-Armand, C., Koziel, V., Kriem, B., Olivier, J.-L., Pillot, T., and Oster, T. (2007). Towards a nutritional approach for prevention of Alzheimer's disease: biochemical and cellular aspects. *J. Neurol. Sci.* 262, 27–36.

Florent-Béchar, S., Desbène, C., Garcia, P., Allouche, A., Youssef, I., Escanyé, M.-C., Koziel, V., Hanse, M., Malaplate-Armand, C., Stenger, C., et al. (2009). The essential role of lipids in Alzheimer's disease. *Biochimie* 91, 804–809.

Floyd, R.A., and Hensley, K. (2002). Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* 23, 795–807.

Folstein, M.F., Folstein, S.E., and McHugh, P.R. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12, 189–198.

Fontana, L., and Klein, S. (2007). Aging, adiposity, and calorie restriction. *JAMA* 297, 986–994.

Fontani, G., Corradeschi, F., Felici, A., Alfatti, F., Migliorini, S., and Lodi, L. (2005). Cognitive and physiological effects of Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in healthy subjects. *Eur J Clin Invest.* 35, 691–699.

Forbes, G.B., and Reina, J.C. (1970). Adult lean body mass declines with age: some longitudinal observations. *Metab. Clin. Exp.* 19, 653–663.

Forlenza, O., Diniz, B., and Gattaz, W. (2010). Diagnosis and biomarkers of pre-dementia in Alzheimer's disease. *BMC Medicine* 8, 89.

Foster, P.P., Rosenblatt, K.P., and Kuljiš, R.O. (2011). Exercise-induced cognitive plasticity, implications for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Front Neurol* 2, 28.

Fotuhi, M., Zandi, P.P., Hayden, K.M., Khachaturian, A.S., Szekely, C.A., Wengreen, H., Munger, R.G., Norton, M.C., Tschanz, J.T., Lyketsos, C.G., et al. (2008). Better cognitive performance in elderly taking antioxidant vitamins E and C supplements in combination with nonsteroidal anti-inflammatory drugs: the Cache County Study. *Alzheimers Dement* 4, 223–227.

Fotuhi, M., Do, D., and Jack, C. (2012). Modifiable factors that alter the size of the hippocampus with ageing. *Nature Reviews Neurology*.

Fox, D.A., Opanashuk, L., Zharkovsky, A., and Weiss, B. (2010). Gene-chemical interactions in the developing mammalian nervous system: Effects on proliferation, neurogenesis and differentiation. *Neurotoxicology* 31, 589–597.

Fraga, C.G., Galleano, M., Verstraeten, S.V., and Oteiza, P.I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol. Aspects Med.* 31, 435–445.

- Fratiglioni, L., and Wang, H.-X. (2007). Brain reserve hypothesis in dementia. *J. Alzheimers Dis.* *12*, 11–22.
- Fratiglioni, L., Wang, H.X., Ericsson, K., Maytan, M., and Winblad, B. (2000). Influence of social network on occurrence of dementia: a community-based longitudinal study. *Lancet* *355*, 1315–1319.
- Freemantle, E., Vandal, M., Tremblay-Mercier, J., Tremblay, S., Blachère, J.C., Bégin, M.E., Brenna, J.T., Windust, A., and Cunnane, S.C. (2006) Omega-3 fatty acids, energy substrates, and brain function during aging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* *75*, 213–220.
- Freund-Levi, Y., Eriksdotter-Jönghagen, M., Cederholm, T., Basun, H., Faxén-Irving, G., Garlind, A., Vedin, I., Vessby, B., Wahlund, L.-O., and Palmblad, J. (2006). Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegaAD study: a randomized double-blind trial. *Arch. Neurol.* *63*, 1402–1408.
- Freund-Levi, Y., Basun, H., Cederholm, T., Faxén-Irving, G., Garlind, A., Grut, M., Vedin, I., Palmblad, J., Wahlund, L.-O., and Eriksdotter-Jönghagen, M. (2008). Omega-3 supplementation in mild to moderate Alzheimer's disease: effects on neuropsychiatric symptoms. *Int J Geriatr Psychiatry* *23*, 161–169.
- Freund-Levi, Y., Hjorth, E., Lindberg, C., Cederholm, T., Faxén-Irving, G., Vedin, I., Palmblad, J., Wahlund, L.-O., Schultzberg, M., Basun, H., et al. (2009). Effects of omega-3 fatty acids on inflammatory markers in cerebrospinal fluid and plasma in Alzheimer's disease: the OmegaAD study. *Dement Geriatr Cogn Disord* *27*, 481–490.
- Frisardi, V., and Imbimbo, B.P. (2012). Metabolic-Cognitive Syndrome: Metabolic Approach for the Management of Alzheimer's Disease Risk. *Journal of Alzheimer's Disease* *30*, S1–S4.
- Frölich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H.G., Engelsberger, S., Humrich, J., Laufer, S., Muschner, D., Thalheimer, A., Türk, A., Hoyer, S., et al. (1998). Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm* *105*, 423–438.
- Frykman, S., Hur, J.-Y., Frånberg, J., Aoki, M., Winblad, B., Nahalkova, J., Behbahani, H., and Tjernberg, L.O. (2010). Synaptic and endosomal localization of active gamma-secretase in rat brain. *PLoS ONE* *5*, e8948.
- Fuentealba, J., Dibarrart, A., Saez-Orellana, F., Fuentes-Fuentes, M.C., Oyanedel, C.N., Guzmán, J., Perez, C., Becerra, J., and Aguayo, L.G. (2012). Synaptic Silencing and Plasma Membrane Dyshomeostasis Induced by Amyloid- β Peptide are Prevented by Aristotelia Chilensis Enriched Extract. *J. Alzheimers Dis.* *31*, 879–889.
- Fulle, S., Protasi, F., Di Tano, G., Pietrangelo, T., Beltramin, A., Boncompagni, S., Vecchiet, L., and Fanò, G. (2004). The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Exp. Gerontol.* *39*, 17–24.
- Fulop, T., Larbi, A., Kotb, R., de Angelis, F., and Pawelec, G. (2011). Aging, immunity, and cancer. *Discov Med* *11*, 537–550.
- Fulop, T., Larbi, A., Witkowski, J.M., McElhaney, J., Loeb, M., Mitnitski, A., and Pawelec, G. (2010). Aging, frailty and age-related diseases. *Biogerontology* *11*, 547–563.
- Furukawa, K., Sopher, B.L., Rydel, R.E., Begley, J.G., Pham, D.G., Martin, G.M., Fox, M., and Mattson, M.P. (1996). Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J. Neurochem.* *67*, 1882–1896.
- Gálíková, M., Klepsatel, P., Senti, G., and Flatt, T. (2011). Steroid hormone regulation of *C. elegans* and *Drosophila* aging and life history. *Exp. Gerontol.* *46*, 141–147.
- Gallez, C. (2005). Rapport sur la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées.
- Gao, F., Taha, A.Y., Ma, K., Chang, L., Kiesewetter, D., and Rapoport, S.I. (2012). Aging decreases rate of docosaehaenoic acid synthesis-secretion from circulating unesterified α -linolenic acid by rat liver. *AGE*. doi 10.1007/s11357-012-9390-1.
- Garcia, M.C., Ward, G., Ma, Y.C., Salem, N., Jr, and Kim, H.Y. (1998). Effect of docosaehaenoic acid on the synthesis of phosphatidylserine in rat brain in microsomes and C6 glioma cells. *J. Neurochem.* *70*, 24–30.
- Garcia, P., Youssef, I., Utvik, J.K., Florent-Béchar, S., Barthélémy, V., Malaplate-Armand, C., Kriem, B., Stenger, C., Koziel, V., Olivier, J.-L., et al. (2010). Ciliary neurotrophic factor cell-based delivery prevents synaptic impairment and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* *30*, 7516–7527.
- García-Alonso, F.J., Jorge-Vidal, V., Ros, G., and Periago, M.J. (2011). Effect of consumption of tomato juice enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids on the lipid profile, antioxidant biomarker status, and cardiovascular disease risk in healthy women. *European Journal of Nutrition* *51*, 415–424.
- Garrel, C., Alessandri, J.-M., Guesnet, P., and Al-Gubory, K.H. (2012). Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 123–131.
- van Gelder, B.M., Tijhuis, M.A.R., Kalmijn, S., Giampaoli, S., Nissinen, A., and Kromhout, D. (2004). Physical activity in relation to cognitive decline in elderly men: the FINE Study. *Neurology* *63*, 2316–2321.
- van Gelder, B.M., Tijhuis, M., Kalmijn, S., and Kromhout, D. (2007). Fish consumption, n-3 fatty acids, and subsequent 5-y cognitive decline in elderly men: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr* *85*, 1142–1147.
- Geleijnse, J.M., Giltay, E.J., Grobbee, D.E., Donders, A.R.T., and Kok, F.J. (2002). Blood pressure response to fish oil supplementation: meta-regression analysis of randomized trials. *J. Hypertens.* *20*, 1493–1499.
- Gerster, H. (1995). The use of n-3 PUFAs (fish oil) in enteral nutrition. *Int J Vitam Nutr Res* *65*, 3–20.
- Ghanim, H., Sia, C.L., Korzeniewski, K., Lohano, T., Abuaysheh, S., Marumganti, A., Chaudhuri, A., and Dandona, P. (2011). A resveratrol and polyphenol preparation suppresses oxidative and inflammatory stress response to a high-fat, high-carbohydrate meal. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *96*, 1409–1414.
- Ghosal, K., Vogt, D.L., Liang, M., Shen, Y., Lamb, B.T., and Pimplikar, S.W. (2009). Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 18367–18372.
- Ghosal, K., Stathopoulos, A., and Pimplikar, S.W. (2010). APP intracellular domain impairs adult neurogenesis in transgenic mice by inducing neuroinflammation. *PLoS ONE* *5*, e11866.
- Gil-Sánchez, A., Demmelmair, H., Parrilla, J.J., Koletzko, B., and Larqué, E. (2011) Mechanisms involved in the selective transfer of long chain polyunsaturated fatty acids to the fetus. *Front Genet.* *2*, 57.
- Gilbert, S.G., and Grant-Webster, K.S. (1995). Neurobehavioral effects of developmental methylmercury exposure. *Environ. Health Perspect.* *103 Suppl 6*, 135–142.
- Glabe, C.G. (2006). Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol. Aging* *27*, 570–575.
- Glaser, E., Alikhani, N. (2010) The organellar peptidosome, PreP: a journey from Arabidopsis to Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* *1797*, 1076–1080.

- Gobal, F.A., and Mehta, J.L. (2010). Management of dyslipidemia in the elderly population. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 4, 375–383.
- Golub, N., Geba, D., Mousa, S.A., Williams, G., and Block, R.C. (2011). Greasing the wheels of managing overweight and obesity with omega-3 fatty acids. *Medical Hypotheses* 77, 1114–1120.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G.A., and Klein, W.L. (2003). Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10417–10422.
- van Goor, S.A., Dijck-Brouwer, D.A., Doornbos, B., Erwich, J.J., Schaafsma, A., Muskiet, F.A., and Hadders-Algra, M. (2010). Supplementation of DHA but not DHA with arachidonic acid during pregnancy and lactation influences general movement quality in 12-week-old term infants. *Br J Nutr.* 103, 235–242.
- van Goor, S.A., Dijck-Brouwer, D.A., Erwich, J.J., Schaafsma, A., and Hadders-Algra, M. (2011) The influence of supplemental docosahexaenoic and arachidonic acids during pregnancy and lactation on neurodevelopment at eighteen months. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 84, 139–146.
- Gorinstein, S., Leontowicz, H., Lojek, A., Leontowicz, M., Ciz, M., Krzeminski, R., Gralak, M., Czerwinski, J., Jastrzebski, Z., Trakhtenberg, S., et al. (2002). Olive Oils Improve Lipid Metabolism and Increase Antioxidant Potential in Rats Fed Diets Containing Cholesterol. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6102–6108.
- Gorjão, R., Verlengia, R., Lima, T.M. de, Soriano, F.G., Boaventura, M.F.C., Kanunfre, C.C., Peres, C.M., Sampaio, S.C., Otton, R., Folador, A., et al. (2006). Effect of docosahexaenoic acid-rich fish oil supplementation on human leukocyte function. *Clin Nutr* 25, 923–938.
- Gottschall, P.E., Ajmo, J.M., Eakin, A.K., Howell, M.D., Mehta, H., and Bailey, L.A. (2010). Panel of synaptic protein ELISAs for evaluating neurological phenotype. *Exp Brain Res* 201, 885–893.
- Gourgon, R., Himbert, D., and Cohen-Solal, A. (1992). Insuffisance cardiaque gauche définition et physiopathologie. *Réanimation Urgences* 1, 819–824.
- Goustard-Langelier, B., Guesnet, P., Durand, G., Antoine, J.M., and Alessandri, J.M. (1999). n-3 and n-6 fatty acid enrichment by dietary fish oil and phospholipid sources in brain cortical areas and nonneural tissues of formula-fed piglets. *Lipids* 34, 5–16.
- Graeber, M.B., Kösel, S., Grasbon-Frodl, E., Möller, H.J., and Mehraein, P. (1998). Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D. *Neurogenetics* 1, 223–228.
- Graff-Radford, N.R., Crook, J.E., Lucas, J., Boeve, B.F., Knopman, D.S., Ivnik, R.J., Smith, G.E., Younkin, L.H., Petersen, R.C., and Younkin, S.G. (2007). Association of low plasma Aβ₄₂/Aβ₄₀ ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 64, 354–362.
- Graff-Radford, N.R. (2011). Can aerobic exercise protect against dementia? *Alzheimers Res Ther* 3, 6.
- Grandgirard, A., Bourre, J.M., Julliard, F., Homayoun, P., Dumont, O., Piciotti, M., and Sebedio, J.L. (1994). Incorporation of trans long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in rat brain structures and retina. *Lipids* 29, 251–258.
- Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309–1312.
- Green, K.N., Martinez-Coria, H., Khashwji, H., Hall, E.B., Yurko-Mauro, K.A., Ellis, L., and LaFerla, F.M. (2007). Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid-beta and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels. *J. Neurosci.* 27, 4385–4395.
- Greenlee, R.T., Naleway, A.L., and Vidaillet, H. (2002). Incidence of myocardial infarction in a general population: the Marshfield Epidemiologic Study Area. *WMJ* 101, 46–52.
- Gu, Y., and Scarmeas, N. (2011). Dietary patterns in Alzheimer's disease and cognitive aging. *Curr Alzheimer Res* 8, 510–519.
- Gu, Y., Nieves, J.W., Stern, Y., Luchsinger, J.A., and Scarmeas, N. (2010). Food combination and Alzheimer disease risk: a protective diet. *Arch. Neurol.* 67, 699–706.
- Guan, Z., Wang, Y., Cairns, N.J., Lantos, P.L., Dallner, G., and Sindelar, P.J. (1999). Decrease and structural modifications of phosphatidylethanolamine plasmalogen in the brain with Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 740–747.
- Guardia-Laguarta, C., Coma, M., Pera, M., Clarimón, J., Sereno, L., Agulló, J.M., Molina-Porcel, L., Gallardo, E., Deng, A., Berezovska, O., et al. (2009). Mild cholesterol depletion reduces amyloid-beta production by impairing APP trafficking to the cell surface. *J. Neurochem.* 110, 220–230.
- Guarente, L., and Kenyon, C. (2000). Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 408, 255–262.
- Guedj, F., Sébrié, C., Rivals, I., Ledru, A., Paly, E., Bizot, J.C., Smith, D., Rubin, E., Gillet, B., Arbones, M., et al. (2009). Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A. *PLoS ONE* 4, e4606.
- Guesnet, P., and Alessandri, J.M. (2011) Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. *Biochimie* 93, 7–12.
- Guillot, N., Caillet, E., Laville, M., Calzada, C., Lagarde, M., and Véricel, E. (2009). Increasing intakes of the long-chain omega-3 docosahexaenoic acid: effects on platelet functions and redox status in healthy men. *FASEB J.* 23, 2909–2916.
- Gunnarsdottir, I., Tomasson, H., Kiely, M., Martínéz, J.A., Bandarra, N.M., Morais, M.G., and Thorsdottir, I. (2008). Inclusion of fish or fish oil in weight-loss diets for young adults: effects on blood lipids. *Int J Obes (Lond)* 32, 1105–1112.
- Guo, S.S., Zeller, C., Chumlea, W.C., and Siervogel, R.M. (1999). Aging, body composition, and lifestyle: the Fels Longitudinal Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 405–411.
- Gustafson, D. (2006). Adiposity indices and dementia. *Lancet Neurol* 5, 713–720.
- Gustafson, D., Rothenberg, E., Blennow, K., Steen, B., and Skoog, I. (2003). An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. *Arch. Intern. Med.* 163, 1524–1528.
- Gylus, K.H., Fein, J.A., Yang, F., Wiley, D.J., Miller, C.A., and Cole, G.M. (2004). Synaptic changes in Alzheimer's disease: increased amyloid-beta and gliosis in surviving terminals is accompanied by decreased PSD-95 fluorescence. *Am. J. Pathol.* 165, 1809–1817.
- Haag, M.D.M., Hofman, A., Koudstaal, P.J., Stricker, B.H.C., and Breteler, M.M.B. (2009). Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 80, 13–17.
- Haass, C., and Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101–112.
- Haass, C., Koo, E.H., Mellon, A., Hung, A.Y., and Selkoe, D.J. (1992). Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357, 500–503.
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., and Sisodia, S. (2012). Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006270.
- Hairi, N.N., Cumming, R.G., Naganathan, V., Handelsman,

- D.J., Le Couteur, D.G., Creasey, H., Waite, L.M., Seibel, M.J., and Sambrook, P.N. (2010). Loss of muscle strength, mass (sarcopenia), and quality (specific force) and its relationship with functional limitation and physical disability: the Concord Health and Ageing in Men Project. *J Am Geriatr Soc* 58, 2055–2062.
- Hallund, J., Madsen, B.O., Bügel, S.H., Jacobsen, C., Jakobsen, J., Krarup, H., Holm, J., Nielsen, H.H., and Lauritzen, L. (2010). The effect of farmed trout on cardiovascular risk markers in healthy men. *Br. J. Nutr.* 104, 1528–1536.
- Hampel, H., Shen, Y., Walsh, D.M., Aisen, P., Shaw, L.M., Zetterberg, H., Trojanowski, J.Q., and Blennow, K. (2010). Biological markers of amyloid beta-related mechanisms in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 223, 334–346.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., and Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 16, 845–850.
- Hanon, O., Pequignot, R., Seux, M.L., Lenoir, H., Bune, A., Rigaud, A.S., Forette, F., and Girerd, X. (2006). Relationship between antihypertensive drug therapy and cognitive function in elderly hypertensive patients with memory complaints. *J. Hypertens.* 24, 2101–2107.
- Hansson, O., Stomrud, E., Vanmechelen, E., Östling, S., Gustafson, D.R., Zetterberg, H., Blennow, K., and Skoog, I. (2012). Evaluation of plasma A β as predictor of Alzheimer's disease in older individuals without dementia: a population-based study. *J. Alzheimers Dis.* 28, 231–238.
- Haque, A.M., Hashimoto, M., Katakura, M., Tanabe, Y., Hara, Y., and Shido, O. (2006). Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *J. Nutr.* 136, 1043–1047.
- Haque, A.M., Hashimoto, M., Katakura, M., Hara, Y., and Shido, O. (2008). Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by Abeta1-40 in rats. *J. Nutr. Biochem.* 19, 619–626.
- Harborne, J.B., and Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.
- Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.
- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.
- Harris, W.S. (1989). Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *J. Lipid Res.* 30, 785–807.
- Harris, W.S. (1997). n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 65, 1645S–1654S.
- Harris, M.I., Flegal, K.M., Cowie, C.C., Eberhardt, M.S., Goldstein, D.E., Little, R.R., Wiedmeyer, H.M., and Byrd-Holt, D.D. (1998). Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Diabetes Care* 21, 518–524.
- Harris, W.S., Miller, M., Tighe, A.P., Davidson, M.H., and Schaefer, E.J. (2008). Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis* 197, 12–24.
- Harris, W.S., Mozaffarian, D., Lefevre, M., Toner, C.D., Colombo, J., Cunnane, S.C., Holden, J.M., Klurfeld, D.M., Morris, M.C., and Whelan, J. (2009). Towards establishing dietary reference intakes for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *J Nutr.* 139, 804S–819S.
- Hashimoto, M., Hossain, S., Shimada, T., Sugioka, K., Yamasaki, H., Fujii, Y., Ishibashi, Y., Oka, J.-I., and Shido, O. (2002). Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J. Neurochem.* 81, 1084–1091.
- Hashimoto, M., Tanabe, Y., Fujii, Y., Kikuta, T., Shibata, H., and Shido, O. (2005). Chronic administration of docosahexaenoic acid ameliorates the impairment of spatial cognition learning ability in amyloid beta-infused rats. *J. Nutr.* 135, 549–555.
- Hashimoto, M., Hossain, S., and Shido, O. (2006). Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid withstands dietary cholesterol-induced decreases in platelet membrane fluidity. *Mol. Cell. Biochem.* 293, 1–8.
- Hausman, D.B., Fischer, J.G., and Johnson, M.A. (2011). Nutrition in centenarians. *Maturitas* 68, 203–209.
- Hayflick, L. (1998). How and why we age. *Exp. Gerontol.* 33, 639–653.
- Hays, N.P., and Roberts, S.B. (2006). The anorexia of aging in humans. *Physiol. Behav.* 88, 257–266.
- He, K., Song, Y., Daviglius, M.L., Liu, K., Van Horn, L., Dyer, A.R., Goldbourt, U., and Greenland, P. (2004a). Fish consumption and incidence of stroke: a meta-analysis of cohort studies. *Stroke* 35, 1538–1542.
- He, K., Song, Y., Daviglius, M.L., Liu, K., Van Horn, L., Dyer, A.R., and Greenland, P. (2004b). Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Circulation* 109, 2705–2711.
- He, C., Qu, X., Cui, L., Wang, J., and Kang, J.X. (2009). Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 11370–11375.
- Hébuterne, X. (2006). La Dénutrition de la personne âgée. *Nutrition Clinique Et Métabolisme* 20, *Supplement 1*, S55–S59.
- Helmersson, J., Årnlöv, J., Larsson, A., and Basu, S. (2009). Low dietary intake of β -carotene, α -tocopherol and ascorbic acid is associated with increased inflammatory and oxidative stress status in a Swedish cohort. *British Journal of Nutrition* 101, 1775–1782.
- Hemming, M.L., and Selkoe, D.J. (2005). Amyloid beta-protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. *J. Biol. Chem.* 280, 37644–37650.
- Henderson, V.W. (1997). The epidemiology of estrogen replacement therapy and Alzheimer's disease. *Neurology* 48, S27–35.
- Hepp, R., Grant, N.J., Aunis, D., and Langley, K. (2000). SNAP25 regulation during adrenal gland development: comparison with differentiation markers and other SNAREs. *J. Comp. Neurol.* 421, 533–542.
- Heude, B., Ducimetière, P., and Berr, C. (2003). Cognitive decline and fatty acid composition of erythrocyte membranes--The EVA Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 803–808.
- Hicks, D.A., Nalivaeva, N.N., and Turner, A.J. (2012). Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signaling. *Front Physiol* 3, 189.
- Higuchi, T., Shirai, N., and Suzuki, H. (2006). Reduction in plasma glucose after lipid changes in mice fed fish oil, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid diets. *Ann. Nutr. Metab.* 50, 147–154.
- Hirano, T., Higa, S., Arimitsu, J., Naka, T., Shima, Y., Ohshima, S., Fujimoto, M., Yamadori, T., Kawase, I., and Tanaka, T. (2004). Flavonoids such as luteolin, fisetin and apigenin are inhibitors of interleukin-4 and interleukin-13 production by activated human basophils. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 134, 135–140.
- Hirohata, M., Hasegawa, K., Tsutsumi-Yasuhara, S., Ohhashi, Y., Ookoshi, T., Ono, K., Yamada, M., and Naiki, H. (2007). The anti-amyloidogenic effect is exerted against Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro by preferential and reversible binding of flavonoids to the amyloid fibril structure. *Biochemistry* 46, 1888–1899.
- Hjartåker, A., Lund, E., and Bjerve, K.S. (1997). Serum

- phospholipid fatty acid composition and habitual intake of marine foods registered by a semi-quantitative food frequency questionnaire. *Eur J Clin Nutr* 51, 736–742.
- Ho, A.J., Raji, C.A., Becker, J.T., Lopez, O.L., Kuller, L.H., Hua, X., Lee, S., Hibar, D., Dinov, I.D., Stein, J.L., et al. (2010). Obesity is linked with lower brain volume in 700 AD and MCI patients. *Neurobiology of Aging* 31, 1326–1339.
- Högyes, E., Nyakas, C., Kiliaan, A., Farkas, T., Penke, B., and Luiten, P.G. (2003) Neuroprotective effect of developmental docosahexaenoic acid supplement against excitotoxic brain damage in infant rats. *Neuroscience*. 119, 999–1012.
- Holub, B.J. (2009). Docosahexaenoic acid (DHA) and cardiovascular disease risk factors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81, 199–204.
- Hollman, P.C., van Trijp, J.M., Buysman, M.N., van der Gaag, M.S., Mengelers, M.J., de Vries, J.H., and Katan, M.B. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.* 418, 152–156.
- Holt, E.M., Steffen, L.M., Moran, A., Basu, S., Steinberger, J., Ross, J.A., Hong, C.-P., and Sinaiko, A.R. (2009). Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. *J Am Diet Assoc* 109, 414–421.
- Hooijmans, C.R., Rutters, F., Dederen, P.J., Gambarota, G., Veltien, A., van Groen, T., Broersen, L.M., Lütjohann, D., Heerschap, A., Tanila, H., et al. (2007). Changes in cerebral blood volume and amyloid pathology in aged Alzheimer APP/PS1 mice on a docosahexaenoic acid (DHA) diet or cholesterol enriched Typical Western Diet (TWD). *Neurobiol. Dis.* 28, 16–29.
- Hooijmans, C.R., Van der Zee, C.E.E.M., Dederen, P.J., Brouwer, K.M., Reijmer, Y.D., van Groen, T., Broersen, L.M., Lütjohann, D., Heerschap, A., and Kiliaan, A.J. (2009). DHA and cholesterol containing diets influence Alzheimer-like pathology, cognition and cerebral vasculature in APPswe/PS1dE9 mice. *Neurobiol. Dis.* 33, 482–498.
- Hossain, S., Hashimoto, M., Katakura, M., Miwa, K., Shimada, T., and Shido, O. (2009). Mechanism of docosahexaenoic acid-induced inhibition of in vitro Abeta1-42 fibrillation and Abeta1-42-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* 111, 568–579.
- Houterman, S., Boshuizen, H.C., Verschuren, W.M.M., Giampaoli, S., Nissinen, A., Menotti, A., and Kromhout, D. (2002). Predicting cardiovascular risk in the elderly in different European countries. *Eur. Heart J.* 23, 294–300.
- Houtkooper, R.H., Argmann, C., Houten, S.M., Cantó, C., Jenning, E.H., Andreux, P.A., Thomas, C., Doenlen, R., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2011). The metabolic footprint of aging in mice. *Sci Rep* 1, 134.
- Hsieh, A.T., and Brenna, J.T. (2009). Dietary docosahexaenoic acid but not arachidonic acid influences central nervous system fatty acid status in baboon neonates. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81, 105–110.
- Hu, J., Igarashi, A., Kamata, M., and Nakagawa, H. (2001). Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta₁₋₄₂); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 276, 47863–47868.
- Huang, T.H., Yang, D.S., Plaskos, N.P., Go, S., Yip, C.M., Fraser, P.E., and Chakrabarty, A. (2000). Structural studies of soluble oligomers of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *J. Mol. Biol.* 297, 73–87.
- Hudry, E., Van Dam, D., Kulik, W., De Deyn, P.P., Stet, F.S., Ahouansou, O., Benraiss, A., Delacourte, A., Bougnères, P., Aubourg, P., et al. (2010). Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Mol. Ther.* 18, 44–53.
- Hughes, V.A., Frontera, W.R., Roubenoff, R., Evans, W.J., and Singh, M.A.F. (2002). Longitudinal changes in body composition in older men and women: role of body weight change and physical activity. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 473–481.
- Hulbert, A.J. (2010). Metabolism and longevity: is there a role for membrane fatty acids? *Integr. Comp. Biol.* 50, 808–817.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., et al. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* 14, 419–427.
- Hutter-Paier, B., Huttunen, H.J., Puglielli, L., Eckman, C.B., Kim, D.Y., Hofmeister, A., Moir, R.D., Domnitz, S.B., Frosch, M.P., Windisch, M., et al. (2004). The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* 44, 227–238.
- Huttunen, H.J., Havas, D., Peach, C., Barren, C., Duller, S., Xia, W., Frosch, M.P., Hutter-Paier, B., Windisch, M., and Kovacs, D.M. (2010). The acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor CI-1011 reverses diffuse brain amyloid pathology in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 777–788.
- Hyun, D.-H., Hernandez, J.O., Mattson, M.P., and de Cabo, R. (2006). The plasma membrane redox system in aging. *Ageing Res. Rev.* 5, 209–220.
- Igarashi, M., Ma, K., Gao, F., Kim, H.-W., Rapoport, S.I., and Rao, J.S. (2011). Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer's disease prefrontal cortex. *J. Alzheimers Dis.* 24, 507–517.
- Ikemoto, A., Nitta, A., Furukawa, S., Ohishi, M., Nakamura, A., Fujii, Y., and Okuyama, H. (2000). Dietary n-3 fatty acid deficiency decreases nerve growth factor content in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 285, 99–102.
- Innis, S.M. (2007). Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J. Nutr.* 137, 855–859.
- Innis, S.M. (2008). Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Res.* 1237, 35–43.
- Jack, C.R., Jr, Knopman, D.S., Jagust, W.J., Shaw, L.M., Aisen, P.S., Weiner, M.W., Petersen, R.C., and Trojanowski, J.Q. (2010). Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 9, 119–128.
- Jacobson, J.L., and Jacobson, S.W. (1996). Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N. Engl. J. Med.* 335, 783–789.
- James, B.D., and Schneider, J.A. (2010). Increasing incidence of dementia in the oldest old: evidence and implications. *Alzheimers Res Ther* 2, 9.
- Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., and Sayadi, S. (2008). Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions* 176, 88–98.
- Jeon, B.T., Jeong, E.A., Shin, H.J., Lee, Y., Lee, D.H., Kim, H.J., Kang, S.S., Cho, G.J., Choi, W.S., and Roh, G.S. (2012). Resveratrol Attenuates Obesity-Associated Peripheral and Central Inflammation and Improves Memory Deficit in Mice Fed a High-Fat Diet. *Diabetes* 61, 1444–1454.
- Jicha, G., and Markesbery, W. (2010). Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease. *Clinical Interventions in Aging* 45.
- Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S., and Drachman, D.A. (2000). Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356, 1627–1631.
- Johnson, D.K., Wilkins, C.H., and Morris, J.C. (2006).

- Accelerated weight loss may precede diagnosis in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* *63*, 1312–1317.
- Johnson, E.J., Chung, H.-Y., Caldarella, S.M., and Snodderly, D.M. (2008). The influence of supplemental lutein and docosahexaenoic acid on serum, lipoproteins, and macular pigmentation. *Am. J. Clin. Nutr.* *87*, 1521–1529.
- Johnson, K.A., Fox, N.C., Sperling, R.A., and Klunk, W.E. (2012). Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* *2*, a006213.
- Jones, C.R., Arai, T., and Rapoport, S.I. (1997). Evidence for the involvement of docosahexaenoic acid in cholinergic stimulated signal transduction at the synapse. *Neurochem. Res.* *22*, 663–670.
- Jorissen, E., Prox, J., Bernreuther, C., Weber, S., Schwanbeck, R., Serneels, L., Snellinx, A., Craessaerts, K., Thathiah, A., Tesseur, I., et al. (2010). The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J. Neurosci.* *30*, 4833–4844.
- Julien, C., Tremblay, C., Phivilay, A., Berthiaume, L., Emond, V., Julien, P., and Calon, F. (2010). High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiol. Aging* *31*, 1516–1531.
- Jump, D.B., Botolin, D., Wang, Y., Xu, J., Christian, B., and Demeure, O. (2005). Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J. Nutr.* *135*, 2503–2506.
- Kalmijn, S., Launer, L.J., Ott, A., Witteman, J.C., Hofman, A., and Breteler, M.M. (1997). Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann. Neurol.* *42*, 776–782.
- Kalmijn, S., van Boxtel, M.P.J., Ocké, M., Verschuren, W.M.M., Kromhout, D., and Launer, L.J. (2004). Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology* *62*, 275–280.
- Kalpouzos, G., Chételat, G., Baron, J.-C., Landeau, B., Mevel, K., Godeau, C., Barré, L., Constans, J.-M., Viader, F., Eustache, F., et al. (2009). Voxel-based mapping of brain gray matter volume and glucose metabolism profiles in normal aging. *Neurobiol. Aging* *30*, 112–124.
- Kalupahana, N.S., Claycombe, K.J., and Moustaid-Moussa, N. (2011). (n-3) Fatty Acids Alleviate Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance: Mechanistic Insights. *Adv Nutr* *2*, 304–316.
- Kariv-Inbal, Z., Yacobson, S., Berkecz, R., Peter, M., Janaky, T., Lütjohann, D., Broersen, L.M., Hartmann, T., and Michaelson, D.M. (2012). The Isoform-Specific Pathological Effects of ApoE4 in vivo are Prevented by a Fish Oil (DHA) Diet and are Modified by Cholesterol. *Journal of Alzheimer's Disease* *28*, 667–683.
- Katan, M.B., Deslypere, J.P., van Birgelen, A.P., Penders, M., and Zegwaard, M. (1997). Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study. *J. Lipid Res.* *38*, 2012–2022.
- Kawabata, T., Nakai, K., Hagiwara, C., Kurokawa, N., Murata, K., Yaginuma, K., and Satoh, H. (2011). Comparison of long-chain polyunsaturated Fatty acids in plasma and erythrocyte phospholipids for biological monitoring. *Nihon Eiseigaku Zasshi* *66*, 108–114.
- Kidd, P.M. (2008). Alzheimer's Disease, Amnesic Mild Cognitive Impairment, and Age-Associated Memory Impairment: Current Understanding and Progress Toward Integrative Prevention. *Alternative medicine review* *13*, 85–115.
- Kandalepas, P.C., and Vassar, R. (2012). Identification and biology of β -secretase. *J. Neurochem.* *120 Suppl 1*, 55–61.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* *325*, 733–736.
- Kang, J.H., Ascherio, A., and Grodstein, F. (2005). Fruit and vegetable consumption and cognitive decline in aging women. *Ann. Neurol.* *57*, 713–720.
- Karlsen, A., Retterstøl, L., Laake, P., Paur, I., Bøhn, S.K., Sandvik, L., and Blomhoff, R. (2007). Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J. Nutr.* *137*, 1951–1954.
- Katzman, R., Terry, R., DeTeresa, R., Brown, T., Davies, P., Fuld, P., Renbing, X., and Peck, A. (1988). Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann. Neurol.* *23*, 138–144.
- Kawakita, E., Hashimoto, M., and Shido, O. (2006). Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. *Neuroscience* *139*, 991–997.
- Kawashima, A., Harada, T., Kami, H., Yano, T., Imada, K., and Mizuguchi, K. (2010). Effects of eicosapentaenoic acid on synaptic plasticity, fatty acid profile and phosphoinositide 3-kinase signaling in rat hippocampus and differentiated PC12 cells. *J. Nutr. Biochem.* *21*, 268–277.
- Kelly, L., Grehan, B., Chiesa, A.D., O'Mara, S.M., Downer, E., Sahyoun, G., Massey, K.A., Nicolaou, A., and Lynch, M.A. (2011). The polyunsaturated fatty acids, EPA and DPA exert a protective effect in the hippocampus of the aged rat. *Neurobiol. Aging* *32*, 2318.e1–15.
- Khansari, N., Shakiba, Y., and Mahmoudi, M. (2009). Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* *3*, 73–80.
- Kilander, L., Nyman, H., Boberg, M., Hansson, L., and Lithell, H. (1998). Hypertension is related to cognitive impairment: a 20-year follow-up of 999 men. *Hypertension* *31*, 780–786.
- Kim, J.S., Kim, J.C., Shim, S.H., Lee, E.J., Jin, W., Bae, K., Son, K.H., Kim, H.P., Kang, S.S., and Chang, H.W. (2006). Chemical constituents of the root of *Dystaenia takeshimana* and their anti-inflammatory activity. *Arch. Pharm. Res.* *29*, 617–623.
- Kim, H.-J., Lee, K.-T., Park, Y.B., Jeon, S.-M., and Choi, M.-S. (2008). Dietary docosahexaenoic acid-rich diacylglycerols ameliorate hepatic steatosis and alter hepatic gene expressions in C57BL/6J-Lep(ob/ob) mice. *Mol Nutr Food Res* *52*, 965–973.
- Kim, S.J., Son, T.G., Park, H.R., Park, M., Kim, M.-S., Kim, H.S., Chung, H.Y., Mattson, M.P., and Lee, J. (2008). Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus. *J. Biol. Chem.* *283*, 14497–14505.
- Kitajka, K., Puskás, L.G., Zvara, A., Hackler, L., Jr, Barceló-Coblijn, G., Yeo, Y.K., and Farkas, T. (2002). The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 2619–2624.
- Kivipelto, M., Helkala, E.L., Hänninen, T., Laakso, M.P., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H., Tuomilehto, J., and Nissinen, A. (2001). Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: A population-based study. *Neurology* *56*, 1683–1689.
- Kivipelto, M., Helkala, E.-L., Laakso, M.P., Hänninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Iivonen, S., Mannermaa, A., Tuomilehto, J., Nissinen, A., et al. (2002). Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Ann. Intern. Med.* *137*, 149–155.

- Kivipelto, M., Ngandu, T., Fratiglioni, L., Viitanen, M., Kåreholt, I., Winblad, B., Helkala, E.-L., Tuomilehto, J., Soininen, H., and Nissinen, A. (2005). Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* *62*, 1556–1560.
- Klencklen, G., Després, O., and Dufour, A. (2012). What do we know about aging and spatial cognition? Reviews and perspectives. *Ageing Res. Rev.* *11*, 123–135.
- Knopman, D., Boland, L.L., Mosley, T., Howard, G., Liao, D., Szkló, M., McGovern, P., and Folsom, A.R. (2001). Cardiovascular risk factors and cognitive decline in middle-aged adults. *Neurology* *56*, 42–48.
- Kodas, E., Galineau, L., Bodard, S., Vancassel, S., Guilloteau, D., Besnard, J.-C., and Chalon, S. (2004). Serotonergic neurotransmission is affected by n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat. *J. Neurochem.* *89*, 695–702.
- Koh, K.K., Quon, M.J., Shin, K.-C., Lim, S., Lee, Y., Sakuma, I., Lee, K., Han, S.H., and Shin, E.K. (2012). Significant differential effects of omega-3 fatty acids and fenofibrate in patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* *220*, 537–544.
- Kohri, T., Nanjo, F., Suzuki, M., Seto, R., Matsumoto, N., Yamakawa, M., Hojo, H., Hara, Y., Desai, D., Amin, S., et al. (2001). Synthesis of (-)-[4-3H]epigallocatechin gallate and its metabolic fate in rats after intravenous administration. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 1042–1048.
- Koistinaho, M., Ort, M., Cimadevilla, J.M., Vondrous, R., Cordell, B., Koistinaho, J., Bures, J., and Higgins, L.S. (2001). Specific spatial learning deficits become severe with age in beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse beta-amyloid deposits but do not form plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 14675–14680.
- Koistinaho, M., Kettunen, M.I., Goldsteins, G., Keinänen, R., Salminen, A., Ort, M., Bures, J., Liu, D., Kauppinen, R.A., Higgins, L.S., et al. (2002). Beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse A beta deposits but do not form plaques show increased ischemic vulnerability: role of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 1610–1615.
- Koo, E.H., Sisodia, S.S., Archer, D.R., Martin, L.J., Weidemann, A., Beyreuther, K., Fischer, P., Masters, C.L., and Price, D.L. (1990). Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 1561–1565.
- Kostyuk, V.A., Potapovich, A.I., Suhan, T.O., de Luca, C., and Korkina, L.G. (2011). Antioxidant and signal modulation properties of plant polyphenols in controlling vascular inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* *658*, 248–256.
- Kotani, S., Sakaguchi, E., Warashina, S., Matsukawa, N., Ishikura, Y., Kiso, Y., Sakakibara, M., Yoshimoto, T., Guo, J., and Yamashima, T. (2006). Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neurosci. Res.* *56*, 159–164.
- Kowall, N.W., Beal, M.F., Busciglio, J., Duffy, L.K., and Yankner, B.A. (1991). An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 7247–7251.
- Kriem, B., Sponne, I., Fifre, A., Malaplate-Armand, C., Lozac'h-Pillot, K., Koziel, V., Yen-Potin, F.T., Bihain, B., Oster, T., Olivier, J.-L., et al. (2005). Cytosolic phospholipase A2 mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid-beta peptide. *FASEB J.* *19*, 85–87.
- Kris-Etherton, P.M., Taylor, D.S., Yu-Poth, S., Huth, P., Moriarty, K., Fishell, V., Hargrove, R.L., Zhao, G., and Etherton, T.D. (2000). Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* *71*, 179S–88S.
- Krishnan, N., Kretschmar, D., Rakshit, K., Chow, E., and Giebultowicz, J.M. (2009). The circadian clock gene period extends healthspan in aging *Drosophila melanogaster*. *Aging (Albany NY)* *1*, 937–948.
- Kröger, E., Verreault, R., Carmichael, P.-H., Lindsay, J., Julien, P., Dewailly, E., Ayotte, P., and Laurin, D. (2009). Omega-3 fatty acids and risk of dementia: the Canadian Study of Health and Aging. *Am. J. Clin. Nutr.* *90*, 184–192.
- Krokan, H.E., Bjerve, K.S., and Mørk, E. (1993). The enteral bioavailability of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid is as good from ethyl esters as from glyceryl esters in spite of lower hydrolytic rates by pancreatic lipase in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* *1168*, 59–67.
- Kroner, Z. (2009). The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Altern Med Rev.* *14*, 373–379.
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., and Georgakilas, A.G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* *711*, 193–201.
- Kuchibhotla, K.V., Goldman, S.T., Lattarulo, C.R., Wu, H.-Y., Hyman, B.T., and Bacskai, B.J. (2008). Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron* *59*, 214–225.
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., and Gage, F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* *16*, 2027–2033.
- Kuo, Y.M., Emmerling, M.R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T.C., Kirkpatrick, J.B., Murdoch, G.H., Ball, M.J., and Roher, A.E. (1996). Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J. Biol. Chem.* *271*, 4077–4081.
- Kurinami, H., Sato, N., Shinohara, M., Takeuchi, D., Takeda, S., Shimamura, M., Ogihara, T., and Morishita, R. (2008). Prevention of amyloid beta-induced memory impairment by fluvastatin, associated with the decrease in amyloid beta accumulation and oxidative stress in amyloid beta injection mouse model. *Int. J. Mol. Med.* *21*, 531–537.
- Kuriyama, S., Hozawa, A., Ohmori, K., Shimazu, T., Matsui, T., Ebihara, S., Awata, S., Nagatomi, R., Arai, H., and Tsuji, I. (2006). Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project 1. *Am. J. Clin. Nutr.* *83*, 355–361.
- Kushwaha, R.S., Hazzard, W.R., and Engblom, J. (1978). High density lipoprotein metabolism in normolipidemic and cholesterol-fed rabbits. *Biochim. Biophys. Acta* *530*, 132–143.
- Kuzuya, M., Ando, F., Iguchi, A., and Shimokata, H. (2002). Changes in serum lipid levels during a 10 year period in a large Japanese population. A cross-sectional and longitudinal study. *Atherosclerosis* *163*, 313–320.
- Lacor, P.N., Buniel, M.C., Chang, L., Fernandez, S.J., Gong, Y., Viola, K.L., Lambert, M.P., Velasco, P.T., Bigio, E.H., Finch, C.E., et al. (2004). Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J. Neurosci.* *24*, 10191–10200.
- Lacor, P.N., Buniel, M.C., Furlow, P.W., Clemente, A.S., Velasco, P.T., Wood, M., Viola, K.L., and Klein, W.L. (2007). Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* *27*, 796–807.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Lagarde, M., Bernoud, N., Brossard, N., Lemaitre-Delaunay, D., Thiès, F., Croset, M., and Lecerc, J. (2001). Lysophosphatidylcholine as a preferred carrier form of

- docosahexaenoic acid to the brain. *J. Mol. Neurosci.* *16*, 201–204; discussion 215–221.
- Lai, Z.C., Moss, M.B., Killiany, R.J., Rosene, D.L., and Herndon, J.G. (1995). Executive system dysfunction in the aged monkey: spatial and object reversal learning. *Neurobiol. Aging* *16*, 947–954.
- Lakowski, B., and Hekimi, S. (1996). Determination of lifespan in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. *Science* *272*, 1010–1013.
- Lalowski, M., Golabek, A., Lemere, C.A., Selkoe, D.J., Wisniewski, H.M., Beavis, R.C., Frangione, B., and Wisniewski, T. (1996). The “nonamyloidogenic” p3 fragment (amyloid beta17–42) is a major constituent of Down’s syndrome cerebellar preamyloid. *J. Biol. Chem.* *271*, 33623–33631.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., et al. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 6448–6453.
- Lambert, J.-C., Schraen-Maschke, S., Richard, F., Fievet, N., Rouaud, O., Berr, C., Dartigues, J.-F., Tzourio, C., Alperovitch, A., Buée, L., et al. (2009). Association of plasma amyloid beta with risk of dementia: the prospective Three-City Study. *Neurology* *73*, 847–853.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer’s amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 3922–3927.
- Larrieu, S., Letenneur, L., Berr, C., Dartigues, J.F., Ritchie, K., Alperovitch, A., Tavernier, B., and Barberger-Gateau, P. (2004). Sociodemographic differences in dietary habits in a population-based sample of elderly subjects: the 3C study. *J. Nutr. Health Aging* *8*, 497–502.
- Larson, E.B., Wang, L., Bowen, J.D., McCormick, W.C., Teri, L., Crane, P., and Kukull, W. (2006). Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann. Intern. Med.* *144*, 73–81.
- Lasikiewicz, N., Hendrickx, H., Talbot, D., and Dye, L. (2012). Exploring stress-induced cognitive impairment in middle aged, centrally obese adults. *Stress* *120606064721006*.
- Laskowitz, D.T., Song, P., Wang, H., Mace, B., Sullivan, P.M., Vitek, M.P., and Dawson, H.N. (2010). Traumatic brain injury exacerbates neurodegenerative pathology: improvement with an apolipoprotein E-based therapeutic. *J. Neurotrauma* *27*, 1983–1995.
- Launer, L.J., Andersen, K., Dewey, M.E., Letenneur, L., Ott, A., Amaducci, L.A., Brayne, C., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Kragh-Sorensen, P., et al. (1999). Rates and risk factors for dementia and Alzheimer’s disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. *European Studies of Dementia. Neurology* *52*, 78–84.
- Launer, L.J., Masaki, K., Petrovitch, H., Foley, D., and Havlik, R.J. (1995). The association between midlife blood pressure levels and late-life cognitive function. The Honolulu-Asia Aging Study. *JAMA* *274*, 1846–1851.
- Laurén, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W., and Strittmatter, S.M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* *457*, 1128–1132.
- Laurin, D., Verreault, R., Lindsay, J., Dewailly, E., and Holub, B.J. (2003). Omega-3 fatty acids and risk of cognitive impairment and dementia. *J. Alzheimers Dis.* *5*, 315–322.
- Lauritzen, L., Hansen, H., Jørgensen, M., and Michaelsen, K. (2001). The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progress in Lipid Res* *40*, 1–94.
- Lauritzen, L., Harsløf, L.B.S., Hellgren, L.I., Pedersen, M.H., Mølgaard, C., and Michaelsen, K.F. (2012). Fish intake, erythrocyte n-3 fatty acid status and metabolic health in Danish adolescent girls and boys. *Br. J. Nutr.* *107*, 697–704.
- Layé, S. (2010). Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *82*, 295–303.
- Ledesma, M.D., Da Silva, J.S., Crassaerts, K., Delacourte, A., De Strooper, B., and Dotti, C.G. (2000). Brain plasmin enhances APP alpha-cleavage and Abeta degradation and is reduced in Alzheimer’s disease brains. *EMBO Rep.* *1*, 530–535.
- Ledesma, M.D., Abad-Rodriguez, J., Galvan, C., Biondi, E., Navarro, P., Delacourte, A., Dingwall, C., and Dotti, C.G. (2003). Raft disorganization leads to reduced plasmin activity in Alzheimer’s disease brains. *EMBO Rep.* *4*, 1190–1196.
- Ledesma, M.D., Martin, M.G., and Dotti, C.G. (2012). Lipid changes in the aged brain: effect on synaptic function and neuronal survival. *Prog. Lipid Res.* *51*, 23–35.
- Leduc, V., Jasmin-Bélanger, S., and Poirier, J. (2010). APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer’s disease. *Trends Mol. Med.* *16*, 469–477.
- Lee, H.-Y., and Oh, B.-H. (2010). Aging and arterial stiffness. *Circ. J.* *74*, 2257–2262.
- Lee, E., and Son, H. (2009). Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep* *42*, 239–244.
- Lee, M.J., Wang, Z.Y., Li, H., Chen, L., Sun, Y., Gobbo, S., Balentine, D.A., and Yang, C.S. (1995). Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *4*, 393–399.
- Lee, J.P., Chang, K.A., Kim, H.S., Kim, S.S., Jeong, S.J., and Suh, Y.H. (2000). APP carboxyl-terminal fragment without or with abeta domain equally induces cytotoxicity in differentiated PC12 cells and cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* *60*, 565–570.
- Lee, J.-Y., Lyoo, I.K., Kim, S.-U., Jang, H.-S., Lee, D.-W., Jeon, H.-J., Park, S.-C., and Cho, M.J. (2005). Intellect declines in healthy elderly subjects and cerebellum. *Psychiatry Clin. Neurosci.* *59*, 45–51.
- Leissring, M.A. (2008). The AbetaCs of Abeta-cleaving proteases. *J. Biol. Chem.* *283*, 29645–29649.
- Lemeshow, S., Letenneur, L., Dartigues, J.F., Lafont, S., Orgogozo, J.M., and Commenges, D. (1998). Illustration of analysis taking into account complex survey considerations: the association between wine consumption and dementia in the PAQUID study. *Personnes Ages Quid. Am. J. Epidemiol.* *148*, 298–306.
- Leonardi, F., Attorri, L., Di Benedetto, R., Di Biase, A., Sanchez, M., Nardini, M., and Salvati, S. (2005). Effect of arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on the oxidative status of C6 glioma cells. *Free Radic. Res.* *39*, 865–874.
- Lepage, G., and Roy, C.C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* *27*, 114–120.
- Leroy, P., Nicolas, A., Thioudellet, C., Oster, T., Wellman, M., and Siest, G. (1993). Rapid liquid chromatographic assay of glutathione in cultured cells. *Biomed. Chromatogr.* *7*, 86–89.
- Leslie, C.C. (2004). Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *70*, 373–376.
- Letenneur, L., Proust-Lima, C., Le Gouge, A., Dartigues, J.F., and Barberger-Gateau, P. (2007). Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am. J. Epidemiol.* *165*, 1364–1371.
- Levant, B., Ozias, M.K., and Carlson, S.E. (2007). Specific brain regions of female rats are differentially depleted of

- docosahexaenoic acid by reproductive activity and an (n-3) fatty acid-deficient diet. *J. Nutr.* *137*, 130–134.
- Lewczuk, P., Kamrowski-Kruck, H., Peters, O., Heuser, I., Jessen, F., Popp, J., Bürger, K., Hampel, H., Frölich, L., Wolf, S., et al. (2010). Soluble amyloid precursor proteins in the cerebrospinal fluid as novel potential biomarkers of Alzheimer's disease: a multicenter study. *Mol. Psychiatry* *15*, 138–145.
- Li, H.L., Roch, J.M., Sundsmo, M., Otero, D., Sisodia, S., Thomas, R., and Saitoh, T. (1997). Defective neurite extension is caused by a mutation in amyloid beta/A4 (A beta) protein precursor found in familial Alzheimer's disease. *J. Neurobiol.* *32*, 469–480.
- Li, G., Higdon, R., Kukull, W.A., Peskind, E., Van Valen Moore, K., Tsuang, D., van Belle, G., McCormick, W., Bowen, J.D., Teri, L., et al. (2004). Statin therapy and risk of dementia in the elderly: a community-based prospective cohort study. *Neurology* *63*, 1624–1628.
- Li, G., Larson, E.B., Sonnen, J.A., Shofer, J.B., Petrie, E.C., Schantz, A., Peskind, E.R., Raskind, M.A., Breitner, J.C.S., and Montine, T.J. (2007). Statin therapy is associated with reduced neuropathologic changes of Alzheimer disease. *Neurology* *69*, 878–885.
- Li, Q., Zhao, H.F., Zhang, Z.F., Liu, Z.G., Pei, X.R., Wang, J.B., and Li, Y. (2009). Long-term green tea catechin administration prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing Abeta1-42 oligomers and upregulating synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus. *Neuroscience* *163*, 741–749.
- Li, M., Fu, W., and Li, X.-A. (2010). Differential fatty acid profile in adipose and non-adipose tissues in obese mice. *Int J Clin Exp Med* *3*, 303–307.
- Li, S., Jin, M., Koeglspenger, T., Shepardson, N.E., Shankar, G.M., and Selkoe, D.J. (2011). Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J. Neurosci.* *31*, 6627–6638.
- Liese, A.D., Nichols, M., Sun, X., D'Agostino, R.B., Jr, and Haffner, S.M. (2009). Adherence to the DASH Diet is inversely associated with incidence of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes Care* *32*, 1434–1436.
- Lim, G.P., Calon, F., Morihara, T., Yang, F., Teter, B., Ubeda, O., Salem, N., Jr, Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2005). A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J. Neurosci.* *25*, 3032–3040.
- Lin, M.T., and Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* *443*, 787–795.
- Lindsay, J., Laurin, D., Verreault, R., Hébert, R., Helliwell, B., Hill, G.B., and McDowell, I. (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am. J. Epidemiol.* *156*, 445–453.
- Lister, J.P., and Barnes, C.A. (2009). Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. *Arch. Neurol.* *66*, 829–833.
- Liu, T., Perry, G., Chan, H.W., Verdile, G., Martins, R.N., Smith, M.A., and Atwood, C.S. (2004). Amyloid-beta-induced toxicity of primary neurons is dependent upon differentiation-associated increases in tau and cyclin-dependent kinase 5 expression. *J. Neurochem.* *88*, 554–563.
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* *22*, 1942–1950.
- Liu, F., Liang, Z., Shi, J., Yin, D., El-Akkad, E., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2006). PKA modulates GSK-3 β - and cdk5-catalyzed phosphorylation of tau in site- and kinase-specific manners. *FEBS Lett.* *580*, 6269–6274.
- Lombardo, Y.B., Hein, G., and Chicco, A. (2007). Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids* *42*, 427–437.
- Lopez, L.B., Kritiz-Silverstein, D., and Barrett Connor, E. (2011). High dietary and plasma levels of the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid are associated with decreased dementia risk: the Rancho Bernardo study. *J Nutr Health Aging* *15*, 25–31.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fair, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* *193*, 265-275.
- Lu, F.S.H., Nielsen, N.S., Timm-Heinrich, M., and Jacobsen, C. (2011). Oxidative stability of marine phospholipids in the liposomal form and their applications. *Lipids* *46*, 3–23.
- Lucas, M., Asselin, G., Mérette, C., Poulin, M.-J., and Dodin, S. (2009). Validation of an FFQ for evaluation of EPA and DHA intake. *Public Health Nutr* *12*, 1783–1790.
- Luccarini, I., Grossi, C., Traini, C., Fiorentini, A., Ed Dami, T., and Casamenti, F. (2012). A β plaque-associated glial reaction as a determinant of apoptotic neuronal death and cortical gliogenesis: a study in APP mutant mice. *Neurosci. Lett.* *506*, 94–99.
- Luchsinger, J.A., and Gustafson, D.R. (2009). Adiposity and Alzheimer's disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* *12*, 15–21.
- Luchsinger, J.A., Tang, M.-X., Shea, S., and Mayeux, R. (2004). Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology* *63*, 1187–1192.
- Luchsinger, J.A., Patel, B., Tang, M.-X., Schupf, N., and Mayeux, R. (2007a). Measures of adiposity and dementia risk in elderly persons. *Arch. Neurol.* *64*, 392–398.
- Luchsinger, J.A., Reitz, C., Patel, B., Tang, M.-X., Manly, J.J., and Mayeux, R. (2007b). Relation of diabetes to mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.* *64*, 570–575.
- Luchsinger, J.A., Cheng, D., Tang, M.X., Schupf, N., and Mayeux, R. (2012). Central obesity in the elderly is related to late-onset Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* *26*, 101–105.
- Luchtman, D.W., and Song, C. (2012). Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from childhood to old age: Findings from animal and clinical studies. *Neuropharmacology*.
- Lukiw, W.J., and Bazan, N.G. (2008). Docosahexaenoic acid and the aging brain. *J. Nutr.* *138*, 2510–2514.
- Lukiw, W.J., Cui, J.-G., Marcheselli, V.L., Bodker, M., Botkjaer, A., Gotlinger, K., Serhan, C.N., and Bazan, N.G. (2005). A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* *115*, 2774–2783.
- Lupien, S.J., and Wan, N. (2004). Successful ageing: from cell to self. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* *359*, 1413–1426.
- Lutz, W., and K C, S. (2010). Dimensions of global population projections: what do we know about future population trends and structures? *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* *365*, 2779–2791.
- Lyketsos, C.G., Breitner, J.C.S., Green, R.C., Martin, B.K., Meinert, C., Piantadosi, S., and Sabbagh, M. (2007). Naproxen and celecoxib do not prevent AD in early results from a randomized controlled trial. *Neurology* *68*, 1800–1808.
- Ma, D.W.L., Seo, J., Switzer, K.C., Fan, Y.-Y., McMurray, D.N., Lupton, J.R., and Chapkin, R.S. (2004). n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. *J. Nutr. Biochem.* *15*, 700–706.
- Ma, Q.-L., Teter, B., Ubeda, O.J., Morihara, T., Dhoot, D., Nyby, M.D., Tuck, M.L., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2007).

- Omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid increases SorLA/LR11, a sorting protein with reduced expression in sporadic Alzheimer's disease (AD): relevance to AD prevention. *J. Neurosci.* 27, 14299–14307.
- Machowetz, A., Gruendel, S., Garcia, A., Harsch, I., Covas, M.-L., Zunft, H.-J., and Koebnick, C. (2008). Effect of Olive Oil Consumption on Serum Resistin Concentrations in Healthy Men. *Hormone and Metabolic Research* 40, 697–701.
- Macedo, C.E., Sandner, G., Angst, M.-J., and Guiberteau, T. (2008). Rewarded associative and instrumental conditioning after neonatal ventral hippocampus lesions in rats. *Brain Res.* 1215, 190–199.
- Maezawa, I., Zimin, P.I., Wulff, H., and Jin, L.-W. (2011). Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* 286, 3693–3706.
- Magdesian, M.H., Carvalho, M.M.V.F., Mendes, F.A., Saraiva, L.M., Juliano, M.A., Juliano, L., Garcia-Abreu, J., and Ferreira, S.T. (2008). Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 9359–9368.
- Majkova, Z., Oesterling, E., Toborek, M., and Hennig, B. (2008). Impact of nutrition on PCB toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25, 192–196.
- Malaplate-Armand, C., Florent-Béchar, S., Youssef, I., Koziel, V., Sponne, I., Kriem, B., Leininger-Muller, B., Olivier, J.-L., Oster, T., and Pillot, T. (2006). Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. *Neurobiol. Dis.* 23, 178–189.
- Malcolm, C.A., McCulloch, D.L., Montgomery, C., Shepherd, A., and Weaver, L.T. (2003). Maternal docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy and visual evoked potential development in term infants: a double blind, prospective, randomised trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 88, F383–390.
- Manach, C., Morand, C., Crespy, V., Demigné, C., Texier, O., Régéat, F., and Rémésy, C. (1998). Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett.* 426, 331–336.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., and Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 230S–242S.
- Manzato, E., Roselli della Rovere, G., Zambon, S., Romanato, G., Corti, M.C., Sartori, L., Baggio, G., and Crepaldi, G. (2003). Cognitive functions are not affected by dietary fatty acids in elderly subjects in the Pro.V.A. study population. *Aging Clin Exp Res* 15, 83–86.
- Marambaud, P., Zhao, H., and Davies, P. (2005). Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J. Biol. Chem.* 280, 37377–37382.
- Marcello, E., Gardoni, F., Mauceri, D., Romorini, S., Jeromin, A., Epis, R., Borroni, B., Cattabeni, F., Sala, C., Padovani, A., et al. (2007). Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity. *J. Neurosci.* 27, 1682–1691.
- Mariussen, E., and Fønnum, F. (2001). The effect of polychlorinated biphenyls on the high affinity uptake of the neurotransmitters, dopamine, serotonin, glutamate and GABA, into rat brain synaptosomes. *Toxicology* 159, 11–21.
- Markesbery, W.R. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 134–147.
- Marmot, M., Banks, J., Richard Blundell, Lessof, C., and Nazroo, J. (2003). Health, wealth and lifestyles of the older population in England: THE 2002 ENGLISH LONGITUDINAL STUDY OF AGEING (England-7 Ridgmount Street London WC1E 7AE: Institute for Fiscal Studies).
- Marnier, L., Nyengaard, J.R., Tang, Y., and Pakkenberg, B. (2003). Marked loss of myelinated nerve fibers in the human brain with age. *J. Comp. Neurol.* 462, 144–152.
- Martin, G.M. (2011). The biology of aging: 1985–2010 and beyond. *FASEB J.* 25, 3756–3762.
- Martin, D.S.D., Spencer, P., Horrobin, D.F., and Lynch, M.A. (2002). Long-term potentiation in aged rats is restored when the age-related decrease in polyunsaturated fatty acid concentration is reversed. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 67, 121–130.
- Martins, I.J., Berger, T., Sharman, M.J., Verdile, G., Fuller, S.J., and Martins, R.N. (2009). Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 111, 1275–1308.
- Masliah, E., Mallory, M., Ge, N., Alford, M., Veinbergs, I., and Roses, A.D. (1995). Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Exp. Neurol.* 136, 107–122.
- Massaro, M., Scoditti, E., Carluccio, M.A., and De Caterina, R. (2010). Nutraceuticals and Prevention of Atherosclerosis: Focus on ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids and Mediterranean Diet Polyphenols. *Cardiovascular Therapeutics* 28, e13–e19.
- Mathis, C.A., Wang, Y., Holt, D.P., Huang, G.-F., Debnath, M.L., and Klunk, W.E. (2003). Synthesis and evaluation of 11C-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J. Med. Chem.* 46, 2740–2754.
- Matsuo, N., Yamada, K., Shoji, K., Mori, M., and Sugano, M. (1997). Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: the structure-inhibitory activity relationship. *Allergy* 52, 58–64.
- Mattson, M.P. (1994). Secreted forms of beta-amyloid precursor protein modulate dendrite outgrowth and calcium responses to glutamate in cultured embryonic hippocampal neurons. *J. Neurobiol.* 25, 439–450.
- Mattson, M.P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430, 631–639.
- Mattsson, N., Zetterberg, H., Hansson, O., Andreasen, N., Parnetti, L., Jonsson, M., Herukka, S.-K., van der Flier, W.M., Blankenstein, M.A., Ewers, M., et al. (2009). CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* 302, 385–393.
- McEniery, C.M., Wilkinson, I.B., and Avolio, A.P. (2007). Age, hypertension and arterial function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 665–671.
- McGinnis, S.M., Brickhouse, M., Pascual, B., and Dickerson, B.C. (2011). Age-related changes in the thickness of cortical zones in humans. *Brain Topogr* 24, 279–291.
- McGue, M., Vaupel, J.W., Holm, N., and Harvald, B. (1993). Longevity is moderately heritable in a sample of Danish twins born 1870–1880. *J Gerontol* 48, B237–244.
- McKenney, J.M., and Sica, D. (2007). Role of prescription omega-3 fatty acids in the treatment of hypertriglyceridemia. *Pharmacotherapy* 27, 715–728.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., and Stadlan, E.M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939–944.
- McMurtry, A., Clark, D.G., Christine, D., and Mendez, M.F. (2006). Early-onset dementia: frequency and causes compared to

late-onset dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 21, 59–64.

McNaughton, S.A., Mishra, G.D., and Brunner, E.J. (2008). Dietary patterns, insulin resistance, and incidence of type 2 diabetes in the Whitehall II Study. *Diabetes Care* 31, 1343–1348.

Mecocci, P., Fanó, G., Fulle, S., MacGarvey, U., Shinobu, L., Polidori, M.C., Cherubini, A., Vecchiet, J., Senin, U., and Beal, M.F. (1999). Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 303–308.

Mell, T., Heekeren, H.R., Marschner, A., Wartenburger, I., Villringer, A., and Reischies, F.M. (2005). Effect of aging on stimulus-reward association learning. *Neuropsychologia* 43, 554–563.

Meng, X., and D'Arcy, C. (2012). Education and dementia in the context of the cognitive reserve hypothesis: a systematic review with meta-analyses and qualitative analyses. *PLoS ONE* 7, e38268.

Merched, A., Xia, Y., Visvikis, S., Serot, J.M., and Siest, G. (2000). Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21, 27–30.

Merendino, N., Loppi, B., D'Aquino, M., Molinari, R., Pessina, G., Romano, C., and Velotti, F. (2005). Docosahexaenoic acid induces apoptosis in the human PaCa-44 pancreatic cancer cell line by active reduced glutathione extrusion and lipid peroxidation. *Nutr Cancer* 52, 225–233.

Merker, K., Stolzing, A., and Grune, T. (2001). Proteolysis, caloric restriction and aging. *Mech. Ageing Dev.* 122, 595–615.

La Merrill, M., and Birnbaum, L.S. (2011). Childhood obesity and environmental chemicals. *Mt. Sinai J. Med.* 78, 22–48.

Meziane, H., Dodart, J.C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S.M., and Ungerer, A. (1998). Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12683–12688.

Michelucci, A., Heurtaux, T., Grandbarbe, L., Morga, E., and Heuschling, P. (2009). Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol.* 210, 3–12.

Middleton, L.E., Barnes, D.E., Lui, L.-Y., and Yaffe, K. (2010). Physical activity over the life course and its association with cognitive performance and impairment in old age. *J Am Geriatr Soc* 58, 1322–1326.

Mielke, M.M., Zandi, P.P., Sjögren, M., Gustafson, D., Ostling, S., Steen, B., and Skoog, I. (2005). High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia. *Neurology* 64, 1689–1695.

Miller, D.B., and O'Callaghan, J.P. (2005). Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Res. Rev.* 4, 123–140.

Miller, M.G., and Shukitt-Hale, B. (2012). Berry Fruit Enhances Beneficial Signaling in the Brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Min, S.Y., Yang, H., Seo, S.G., Shin, S.H., Chung, M.-Y., Kim, J., Lee, S.J., Lee, H.J., and Lee, K.W. (2012). Cocoa polyphenols suppress adipogenesis in vitro and obesity in vivo by targeting insulin receptor. *Int J Obes.* doi: 10.1038/ijo.2012.85.

Mines, M.A., Beurel, E., and Jope, R.S. (2011). Regulation of cell survival mechanisms in Alzheimer's disease by glycogen synthase kinase-3. *Int J Alzheimers Dis* 2011, 861072.

Ming, G.-L., and Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687–702.

Minogue, A.M., Stubbs, A.K., Frigerio, C.S., Boland, B., Fadeeva, J.V., Tang, J., Selkoe, D.J., and Walsh, D.M. (2009). gamma-secretase processing of APLP1 leads to the production of a p3-like peptide that does not aggregate and is not toxic to

neurons. *Brain Res.* 1262, 89–99.

Miranda, S., Opazo, C., Larrondo, L.F., Muñoz, F.J., Ruiz, F., Leighton, F., and Inestrosa, N.C. (2000). The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid β -peptide in Alzheimer's disease. *Progress Neurobiol.* 62, 633–648.

de la Monte, S.M. (2012). Contributions of brain insulin resistance and deficiency in amyloid-related neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Drugs* 72, 49–66.

Montgomery, C., Speake, B.K., Cameron, A., Sattar, N., and Weaver, L.T. (2003). Maternal docosahexaenoic acid supplementation and fetal accretion. *Br J Nutr.* 90, 135–145.

Montine, T.J., and Morrow, J.D. (2005). Fatty acid oxidation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 166, 1283–1289.

Mora, F., Segovia, G., and del Arco, A. (2007). Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res Rev* 55, 78–88.

Mora, F., Segovia, G., and Del Arco, A. (2008). Glutamate-dopamine-GABA interactions in the aging basal ganglia. *Brain Res Rev* 58, 340–353.

Moreno-Luna, R., Muñoz-Hernandez, R., Miranda, M.L., Costa, A.F., Jimenez-Jimenez, L., Vallejo-Vaz, A.J., Muriana, F.J.G., Villar, J., and Stiefel, P. (2012). Olive Oil Polyphenols Decrease Blood Pressure and Improve Endothelial Function in Young Women with Mild Hypertension. *Am. J. Hypertens.*

Morgan C, Colombres M, Nunez MT, et al. (2004) Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 74, 323-349.

Mori, T., Paris, D., Town, T., Rojiani, A.M., Sparks, D.L., Delledonne, A., Crawford, F., Abdullah, L.I., Humphrey, J.A., Dickson, D.W., et al. (2001). Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP(SW) mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 778–785.

Mori, T., Rezai-Zadeh, K., Koyama, N., Arendash, G.W., Yamaguchi, H., Kakuda, N., Horikoshi-Sakuraba, Y., Tan, J., and Town, T. (2012). Tannic acid is a natural β -secretase inhibitor that prevents cognitive impairment and mitigates Alzheimer-like pathology in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 287, 6912–6927.

Morley, J.E. (1997). Anorexia of aging: physiologic and pathologic. *Am. J. Clin. Nutr.* 66, 760–773.

Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11, 47–60.

Morris, M.C. (2009). The role of nutrition in Alzheimer's disease: epidemiological evidence. *European Journal of Neurology* 16, 1–7.

Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Bennett, D.A., Aggarwal, N., Schneider, J., and Wilson, R.S. (2003a). Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 60, 194–200.

Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Bennett, D.A., Wilson, R.S., Aggarwal, N., and Schneider, J. (2003b). Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 60, 940–946.

Morris, M.C., Evans, D.A., Tangney, C.C., Bienias, J.L., and Wilson, R.S. (2005). Fish consumption and cognitive decline with age in a large community study. *Arch. Neurol.* 62, 1849–1853.

Morris, M.C., Evans, D.A., Tangney, C.C., Bienias, J.L., and Wilson, R.S. (2006). Associations of vegetable and fruit consumption with age-related cognitive change. *Neurology* 67, 1370–1376.

Morris, M., Maeda, S., Vessel, K., and Mucke, L. (2011). The many faces of tau. *Neuron* 70, 410–426.

- Morrison, J.H., and Baxter, M.G. (2012). The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 240–250.
- Moskaug, J.Ø., Carlsen, H., Myhrstad, M.C.W., and Blomhoff, R. (2005). Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 277S–283S.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mousseau N, Derreumaux P. (2005) Exploring the early steps of amyloid peptide aggregation by computers. *Acc Chem Res.* 38, 885–891.
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.* 20, 4050–4058.
- Mukaetova-Ladinska, E.B., Xuereb, J.H., Garcia-Sierra, F., Hurt, J., Gertz, H.-J., Hills, R., Brayne, C., Huppert, F.A., Paykel, E.S., McGee, M.A., et al. (2009). Lewy body variant of Alzheimer's disease: selective neocortical loss of t-SNARE proteins and loss of MAP2 and alpha-synuclein in medial temporal lobe. *Scientific World J.* 9, 1463–1475.
- Müller, T., Meyer, H.E., Egensperger, R., and Marcus, K. (2008). The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 85, 393–406.
- Mukherjee, S., Zha, X., Tabas, I., and Maxfield, F.R. (1998). Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. *Biophys. J.* 75, 1915–1925.
- Murayama, O., Tomita, T., Nihonmatsu, N., Murayama, M., Sun, X., Honda, T., Iwatsubo, T., and Takashima, A. (1999). Enhancement of amyloid beta 42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 265, 61–63.
- Myhrstad, M.C.W., Carlsen, H., Nordström, O., Blomhoff, R., and Moskaug, J.Ø. (2002). Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 386–393.
- Nagao, K., and Yanagita, T. (2008). Bioactive lipids in metabolic syndrome. *Prog. Lipid Res.* 47, 127–146.
- Nantz, M.P., Rowe, C.A., Nieves, C., Jr, and Percival, S.S. (2006). Immunity and antioxidant capacity in humans is enhanced by consumption of a dried, encapsulated fruit and vegetable juice concentrate. *J. Nutr.* 136, 2606–2610.
- Neubronner, J., Schuchardt, J.P., Kressel, G., Merkel, M., von Schacky, C., and Hahn, A. (2011). Enhanced increase of omega-3 index in response to long-term n-3 fatty acid supplementation from triacylglycerides versus ethyl esters. *Eur J Clin Nutr* 65, 247–254.
- Newman, J., Aucompaugh, A.G., Schell, L.M., Denham, M., DeCaprio, A.P., Gallo, M.V., Ravenscroft, J., Kao, C.-C., Hanover, M.R., David, D., et al. (2006). PCBs and cognitive functioning of Mohawk adolescents. *Neurotoxicol Teratol* 28, 439–445.
- Ng, T.-P., Feng, L., Niti, M., Kua, E.-H., and Yap, K.-B. (2008). Tea consumption and cognitive impairment and decline in older Chinese adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 224–231.
- Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D.D.M., and Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457, 981–989.
- Nishikawa, M., Kimura, S., and Akaike, N. (1994). Facilitatory effect of docosahexaenoic acid on N-methyl-D-aspartate response in pyramidal neurones of rat cerebral cortex. *J. Physiol. (Lond.)* 475, 83–93.
- Noreen, E.E., Sass, M.J., Crowe, M.L., Pabon, V.A., Brandauer, J., and Averill, L.K. (2010). Effects of supplemental fish oil on resting metabolic rate, body composition, and salivary cortisol in healthy adults. *J Int Soc Sports Nutr* 7, 31.
- Nourhashémi, F., Deschamps, V., Larrieu, S., Letenneur, L., Dartigues, J.-F., and Barberger-Gateau, P. (2003). Body mass index and incidence of dementia: the PAQUID study. *Neurology* 60, 117–119.
- Nurk, E., Drevon, C.A., Refsum, H., Solvoll, K., Vollset, S.E., Nygård, O., Nygaard, H.A., Engedal, K., Tell, G.S., and Smith, A.D. (2007). Cognitive performance among the elderly and dietary fish intake: the Hordaland Health Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 86, 1470–1478.
- O'Rourke, M.F. (2007). Arterial aging: pathophysiological principles. *Vasc Med* 12, 329–341.
- O'Sullivan, T.A., Ambrosini, G.L., Mori, T.A., Beilin, L.J., and Oddy, W.H. (2011). Omega-3 Index correlates with healthier food consumption in adolescents and with reduced cardiovascular disease risk factors in adolescent boys. *Lipids* 46, 59–67.
- Obregon, D.F., Rezai-Zadeh, K., Bai, Y., Sun, N., Hou, H., Ehrhart, J., Zeng, J., Mori, T., Arendash, G.W., Shytle, D., et al. (2006). ADAM10 activation is required for green tea (-)epigallocatechin-3-gallate-induced alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 281, 16419–16427.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421.
- Ohkawara, T., Nagase, H., Koh, C.-S., and Nakayama, K. (2011). The amyloid precursor protein intracellular domain alters gene expression and induces neuron-specific apoptosis. *Gene* 475, 1–9.
- van Oijen, M., Hofman, A., Soares, H.D., Koudstaal, P.J., and Breteler, M.M.B. (2006). Plasma Abeta(1-40) and Abeta(1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *Lancet Neurol* 5, 655–660.
- Oi-Kano, Y., Kawada, T., Watanabe, T., Koyama, F., Watanabe, K., Senbongi, R., and Iwai, K. (2008). Oleuropein, a phenolic compound in extra virgin olive oil, increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 54, 363–370.
- Okonkwo, O.C., Alosco, M.L., Griffith, H.R., Mielke, M.M., Shaw, L.M., Trojanowski, J.Q., and Tremont, G. (2010). Cerebrospinal fluid abnormalities and rate of decline in everyday function across the dementia spectrum: normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 67, 688–696.
- Oksman, M., Iivonen, H., Hoggies, E., Amtul, Z., Penke, B., Leenders, I., Broersen, L., Lütjohann, D., Hartmann, T., and Tanila, H. (2006). Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 23, 563–572.
- Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S., and Stadtman, E.R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* 262, 5488–5491.
- Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H., and Yamada, M. (2003). Potent anti-amyloidogenic and fibril-

- destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *87*, 172–181.
- Oster, T., and Pillot, T. (2010). Docosahexaenoic acid and synaptic protection in Alzheimer's disease mice. *Biochim. Biophys. Acta* *1801*, 791–798.
- Ott, A., Stolk, R.P., van Harskamp, F., Pols, H.A., Hofman, A., and Breteler, M.M. (1999). Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* *53*, 1937–1942.
- Overman, A., Bumrungpert, A., Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C.-C., West, T., Dawson, B., Jia, W., and McIntosh, M. (2010). Polyphenol-rich grape powder extract (GPE) attenuates inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *Int J Obes (Lond)* *34*, 800–808.
- Overman, A., Chuang, C.-C., and McIntosh, M. (2011). Quercetin attenuates inflammation in human macrophages and adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *Int J Obes (Lond)* *35*, 1165–1172.
- Oyler, G.A., Polli, J.W., Wilson, M.C., and Billingsley, M.L. (1991). Developmental expression of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP25) in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 5247–5251.
- Palmer, H.J., and Paulson, K.E. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr. Rev.* *55*, 353–361.
- Panza, F., D'Introno, A., Colacicco, A.M., Capurso, C., Pichichero, G., Capurso, S.A., Capurso, A., and Solfrizzi, V. (2006). Lipid metabolism in cognitive decline and dementia. *Brain Res Rev* *51*, 275–292.
- Parent, A.-S., Naveau, E., Gerard, A., Bourguignon, J.-P., and Westbrook, G.L. (2011). Early developmental actions of endocrine disruptors on the hypothalamus, hippocampus, and cerebral cortex. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* *14*, 328–345.
- Paris, D., Townsend, K.P., Humphrey, J., Obregon, D.F., Yokota, K., and Mullan, M. (2002). Statins inhibit A beta-neurotoxicity in vitro and A beta-induced vasoconstriction and inflammation in rat aortae. *Atherosclerosis* *161*, 293–299.
- Park, H.-H., Lee, S., Son, H.-Y., Park, S.-B., Kim, M.-S., Choi, E.-J., Singh, T.S.K., Ha, J.-H., Lee, M.-G., Kim, J.-E., et al. (2008). Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch. Pharm. Res.* *31*, 1303–1311.
- Park, Y., Nam, S., Yi, H.-J., Hong, H.-J., and Lee, M. (2009). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids increase oxidative stress in rats with intracerebral hemorrhagic stroke. *Nutr Res* *29*, 812–818.
- Parks, A.L., and Curtis, D. (2007). Presenilin diversifies its portfolio. *Trends Genet.* *23*, 140–150.
- Parnetti, L., Lanari, A., Silvestrelli, G., Saggese, E., and Reboldi, P. (2006). Diagnosing prodromal Alzheimer's disease: role of CSF biochemical markers. *Mech. Ageing Dev.* *127*, 129–132.
- Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E.H., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (1999). Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry* *38*, 9728–9734.
- Pasternak, S.H., Callahan, J.W., and Mahuran, D.J. (2004). The role of the endosomal/lysosomal system in amyloid-beta production and the pathophysiology of Alzheimer's disease: reexamining the spatial paradox from a lysosomal perspective. *J. Alzheimers Dis.* *6*, 53–65.
- Patwardhan, M.B., McCrory, D.C., Matchar, D.B., Samsa, G.P., and Rutschmann, O.T. (2004). Alzheimer Disease: Operating Characteristics of PET—A Meta-Analysis I. *Radiology* *231*, 73–80.
- Pawlosky, R.J., Hibbeln, J.R., Novotny, J.A., and Salem, N., Jr (2001). Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *J. Lipid Res.* *42*, 1257–1265.
- Paxinos, G., and Franklin, K.B.J. (San Diego, Calif.; London: Academic, c2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates / George Paxinos, Keith B.J. Franklin* (San Diego, Calif.; London: Academic).
- Payette, H., and Shatenstein, B. (2005). Determinants of healthy eating in community-dwelling elderly people. *Can J Public Health* *96 Suppl 3*, S27–31, S30–35.
- Pedersen, M.H., Mølgaard, C., Hellgren, L.I., and Lauritzen, L. (2010). Effects of fish oil supplementation on markers of the metabolic syndrome. *J. Pediatr.* *157*, 395–400, 400.e1.
- Pégorier, J.-P., Le May, C., and Girard, J. (2004). Control of gene expression by fatty acids. *J. Nutr.* *134*, 2444S–2449S.
- Peng, C., Zuo, Y., Kwan, K.M., Liang, Y., Ma, K.Y., Chan, H.Y.E., Huang, Y., Yu, H., and Chen, Z.-Y. (2012). Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* *47*, 170–178.
- Perez, C.A., Wei, Y., and Guo, M. (2009). Iron-binding and anti-Fenton properties of baicalein and baicalin. *J. Inorg. Biochem.* *103*, 326–332.
- Perez, S.E., Berg, B.M., Moore, K.A., He, B., Counts, S.E., Fritz, J.J., Hu, Y.-S., Lazarov, O., Lah, J.J., and Mufson, E.J. (2010). DHA diet reduces AD pathology in young APP^{swe}/PS1 Delta E9 transgenic mice: possible gender effects. *J. Neurosci. Res.* *88*, 1026–1040.
- Perl, D.P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt. Sinai J. Med.* *77*, 32–42.
- Perluigi, M., Di Domenico, F., Giorgi, A., Schininà, M.E., Coccia, R., Cini, C., Bellia, F., Cambria, M.T., Cornelius, C., Butterfield, D.A., et al. (2010). Redox proteomics in aging rat brain: involvement of mitochondrial reduced glutathione status and mitochondrial protein oxidation in the aging process. *J. Neurosci. Res.* *88*, 3498–3507.
- Peters, A. (2009). The effects of normal aging on myelinated nerve fibers in monkey central nervous system. *Front Neuroanat* *3*, 11.
- Peters, A., Morrison, J.H., Rosene, D.L., and Hyman, B.T. (1998). Feature article: are neurons lost from the primate cerebral cortex during normal aging? *Cereb. Cortex* *8*, 295–300.
- Philibert, A., Vanier, C., Abdelouahab, N., Chan, H.M., and Mergler, D. (2006). Fish intake and serum fatty acid profiles from freshwater fish. *Am. J. Clin. Nutr.* *84*, 1299–1307.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* *63*, 1035–1042.
- Pifferi, F., Roux, F., Langelier, B., Alessandri, J.-M., Vancassel, S., Jouin, M., Lavalie, M., and Guesnet, P. (2005). (n-3) polyunsaturated fatty acid deficiency reduces the expression of both isoforms of the brain glucose transporter GLUT1 in rats. *J. Nutr.* *135*, 2241–2246.
- Pifferi, F., Jouin, M., Alessandri, J.M., Haedke, U., Roux, F., Perrière, N., Denis, I., Lavalie, M., and Guesnet, P. (2007). n-3 Fatty acids modulate brain glucose transport in endothelial cells of the blood-brain barrier. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *77*, 279–286.
- Pifferi, F., Perret, M., Guesnet, P., Aujard, F., and Alessandri, J.-M. (2012). Fatty Acid Composition of the Brain, Retina, Liver and Adipose Tissue of the Grey Mouse Lemur (*Microcebus murinus*, Primate). *Lipids* *47*, 793–801.
- Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Talussot, C., Brasseur, R., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., and Lins, L. (1996). Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* *271*, 28757–28765.
- Pillot, T., Drouet, B., Queillé, S., Labeur, C., Vandekerckhove,

- J., Rosseneu, M., Pinçon-Raymond, M., and Chambaz, J. (1999). The nonfibrillar amyloid beta-peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. *J. Neurochem.* *73*, 1626–1634.
- Plassman, B.L., Havlik, R.J., Steffens, D.C., Helms, M.J., Newman, T.N., Drosdick, D., Phillips, C., Gau, B.A., Welsh-Bohmer, K.A., Burke, J.R., et al. (2000). Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology* *55*, 1158–1166.
- Plourde, M., and Cunnane, S.C. (2007). Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl Physiol Nutr Metab* *32*, 619–634.
- Plourde, M., Fortier, M., Vandal, M., Tremblay-Mercier, J., Freemantle, E., Bégin, M., Pifferi, F., and Cunnane, S.C. (2007). Unresolved issues in the link between docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *77*, 301–308.
- Poling, J.S., Vicini, S., Rogawski, M.A., and Salem, N., Jr (1996). Docosahexaenoic acid block of neuronal voltage-gated K⁺ channels: subunit selective antagonism by zinc. *Neuropharmacology* *35*, 969–982.
- Poppitt, S.D., Kilmartin, P., Butler, P., and Keogh, G.F. (2005). Assessment of erythrocyte phospholipid fatty acid composition as a biomarker for dietary MUFA, PUFA or saturated fatty acid intake in a controlled cross-over intervention trial. *Lipids Health Dis* *4*, 30.
- Porat, Y., Abramowitz, A., and Gazit, E. (2006). Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem Biol Drug Des* *67*, 27–37.
- Pozueta, J., Lefort, R., and Shelanski, M.L. (2012). Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models. *Neuroscience*.
- Pu, P., Gao, D.-M., Mohamed, S., Chen, J., Zhang, J., Zhou, X.-Y., Zhou, N.-J., Xie, J., and Jiang, H. (2012). Naringin ameliorates metabolic syndrome by activating AMP-activated protein kinase in mice fed a high-fat diet. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *518*, 61–70.
- Puga, G.M., Meyer, C., Everman, S., Mandarino, L.J., and Katsanos, C.S. (2011). Postprandial lipemia in the elderly involves increased incorporation of ingested fat in plasma free fatty acids and small (Sf 20-400) triglyceride-rich lipoproteins. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *301*, E356–361.
- Puskás, L.G., Kitajka, K., Nyakas, C., Barcelo-Coblijn, G., and Farkas, T. (2003). Short-term administration of omega 3 fatty acids from fish oil results in increased transthyretin transcription in old rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 1580–1585.
- Qin, X.-Y., Cheng, Y., Cui, J., Zhang, Y., and Yu, L.-C. (2009). Potential protection of curcumin against amyloid beta-induced toxicity on cultured rat prefrontal cortical neurons. *Neurosci. Lett.* *463*, 158–161.
- Qin, X.-Y., Cheng, Y., and Yu, L.-C. (2012). Potential protection of green tea polyphenols against intracellular amyloid beta-induced toxicity on primary cultured prefrontal cortical neurons of rats. *Neurosci. Lett.* *513*, 170–173.
- Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirotsu, N., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T.C., Wang, R., et al. (2005). Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J. Neurosci.* *25*, 436–445.
- Quan, G., Xie, C., Dietschy, J.M., and Turley, S.D. (2003). Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *146*, 87–98.
- Raederstorff, D. (2009). Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review. *Int J Vitam Nutr Res* *79*, 152–165.
- Rajamoorthi, K., Petrache, H.I., McIntosh, T.J., and Brown, M.F. (2005). Packing and viscoelasticity of polyunsaturated omega-3 and omega-6 lipid bilayers as seen by (2)H NMR and X-ray diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* *127*, 1576–1588.
- Ramassamy, C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur. J. Pharmacol.* *545*, 51–64.
- Ramírez-Tortosa, M.C., Suárez, A., Gómez, M.C., Mir, A., Ros, E., Mataix, J., and Gil, A. (1999). Effect of extra-virgin olive oil and fish-oil supplementation on plasma lipids and susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative alteration in free-living spanish male patients with peripheral vascular disease. *Clin Nutr* *18*, 167–174.
- Rao, J.S., Ertley, R.N., Lee, H.-J., DeMar, J.C., Jr, Arnold, J.T., Rapoport, S.I., and Bazinet, R.P. (2007). n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. *Mol. Psychiatry* *12*, 36–46.
- Rapoport, S.I. (2008). Arachidonic acid and the brain. *J. Nutr.* *138*, 2515–2520.
- Rapoport, S.I., Rao, J.S., and Igarashi, M. (2007). Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *77*, 251–261.
- Rapoport, S.I., Ramadan, E., and Basselin, M. (2011). Docosahexaenoic acid (DHA) incorporation into the brain from plasma, as an in vivo biomarker of brain DHA metabolism and neurotransmission. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *96*, 109–113.
- Ray, S., Britschgi, M., Herbert, C., Takeda-Uchimura, Y., Boxer, A., Blennow, K., Friedman, L.F., Galasko, D.R., Jutel, M., Karydas, A., et al. (2007). Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat. Med.* *13*, 1359–1362.
- Rayalam, S., Dellafera, M., and Baile, C. (2008). Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *The Journal of Nutritional Biochemistry* *19*, 717–726.
- Raz, N., Lindenberger, U., Rodrigue, K.M., Kennedy, K.M., Head, D., Williamson, A., Dahle, C., Gerstorf, D., and Acker, J.D. (2005). Regional brain changes in aging healthy adults: general trends, individual differences and modifiers. *Cereb. Cortex* *15*, 1676–1689.
- Refolo, L.M., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G.S., Sambamurti, K., Duff, K., and Pappolla, M.A. (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Dis.* *7*, 321–331.
- Refolo, L.M., Pappolla, M.A., LaFrancois, J., Malester, B., Schmidt, S.D., Thomas-Bryant, T., Tint, G.S., Wang, R., Mercken, M., Petanceska, S.S., et al. (2001). A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* *8*, 890–899.
- Reich, E.E., Markesbery, W.R., Roberts, L.J., 2nd, Swift, L.L., Morrow, J.D., and Montine, T.J. (2001). Brain regional quantification of F-ring and D/E-ring isoprostanes and neuroprostanes in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* *158*, 293–297.
- Reiman, E.M., Chen, K., Alexander, G.E., Caselli, R.J., Bandy, D., Osborne, D., Saunders, A.M., and Hardy, J. (2004). Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 284–289.
- Reiman, E.M., Chen, K., Langbaum, J.B.S., Lee, W., Reschke, C., Bandy, D., Alexander, G.E., and Caselli, R.J. (2010). Higher serum total cholesterol levels in late middle age are associated

- with glucose hypometabolism in brain regions affected by Alzheimer's disease and normal aging. *Neuroimage* 49, 169–176.
- Rein, D., Lotito, S., Holt, R.R., Keen, C.L., Schmitz, H.H., and Fraga, C.G. (2000). Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J. Nutr.* 130, 2109S–14S.
- Reines, S.A., Block, G.A., Morris, J.C., Liu, G., Nessly, M.L., Lines, C.R., Norman, B.A., and Baranak, C.C. (2004). Rofecoxib: no effect on Alzheimer's disease in a 1-year, randomized, blinded, controlled study. *Neurology* 62, 66–71.
- Reinhard, C., Hébert, S.S., and De Strooper, B. (2005). The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J.* 24, 3996–4006.
- Reisberg, B., Ferris, S.H., de Leon, M.J., and Crook, T. (1982). The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry* 139, 1136–1139.
- Reiter, R.J. (1995). Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9, 526–533.
- Reitz, C., Tang, M.-X., Luchsinger, J., and Mayeux, R. (2004). Relation of plasma lipids to Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch. Neurol.* 61, 705–714.
- Ren, J., Meng, S., Lekka, C.E., and Kaxiras, E. (2008). Complexation of flavonoids with iron: structure and optical signatures. *J Phys Chem B* 112, 1845–1850.
- Renner, M., Lacor, P.N., Velasco, P.T., Xu, J., Contractor, A., Klein, W.L., and Triller, A. (2010). Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* 66, 739–754.
- Renno, W.M., Al-Maghrebi, M., and Al-Banaw, A. (2012). (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) attenuates functional deficits and morphological alterations by diminishing apoptotic gene overexpression in skeletal muscles after sciatic nerve crush injury. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 385, 807–822.
- van de Rest, O., Geleijnse, J.M., Kok, F.J., van Staveren, W.A., Dullemeijer, C., Oudekerk, M.G.M., Beekman, A.T.F., and de Groot, C.P.G.M. (2008). Effect of fish oil on cognitive performance in older subjects: a randomized, controlled trial. *Neurology* 71, 430–438.
- Rezai-Zadeh, K., Shytle, D., Sun, N., Mori, T., Hou, H., Jeannot, D., Ehrhart, J., Townsend, K., Zeng, J., Morgan, D., et al. (2005). Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. *J. Neurosci.* 25, 8807–8814.
- Rice, D., and Barone, S., Jr (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* 108 Suppl 3, 511–533.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933–956.
- Riddle, D.R., Sonntag, W.E., and Lichtenwalner, R.J. (2003). Microvascular plasticity in aging. *Ageing Res. Rev.* 2, 149–168.
- de Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C., and Brinkman, U.A.T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatogr A* 1112, 31–63.
- Ring, S., Weyer, S.W., Kilian, S.B., Waldron, E., Pietzik, C.U., Philippov, M.A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C.B., Korte, M., et al. (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J. Neurosci.* 27, 7817–7826.
- Robinson, S., Syddall, H., Jameson, K., Batelaan, S., Martin, H., Dennison, E.M., Cooper, C., and Sayer, A.A. (2009). Current patterns of diet in community-dwelling older men and women: results from the Hertfordshire Cohort Study. *Age Ageing* 38, 594–599.
- Robson, L.G., Dyall, S., Sidloff, D., and Michael-Titus, A.T. (2010). Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase the neurite outgrowth of rat sensory neurones throughout development and in aged animals. *Neurobiol. Aging* 31, 678–687.
- Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G., and Murri, L. (2003). Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res. Bull.* 61, 1–24.
- Rockwood, K., Kirkland, S., Hogan, D.B., MacKnight, C., Merry, H., Verreault, R., Wolfson, C., and McDowell, I. (2002). Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch. Neurol.* 59, 223–227.
- Roegge, C.S., Morris, J.R., Villareal, S., Wang, V.C., Powers, B.E., Klintsova, A.Y., Greenough, W.T., Pessah, I.N., and Schantz, S.L. (2006). Purkinje cell and cerebellar effects following developmental exposure to PCBs and/or MeHg. *Neurotoxicol Teratol* 28, 74–85.
- Roger, V.L., Go, A.S., Lloyd-Jones, D.M., Adams, R.J., Berry, J.D., Brown, T.M., Carnethon, M.R., Dai, S., de Simone, G., Ford, E.S., et al. (2011). Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 123, e18–e209.
- Rogers, J., Kirby, L.C., Hempelman, S.R., Berry, D.L., McGeer, P.L., Kaszniak, A.W., Zalinski, J., Cofield, M., Mansukhani, L., and Willson, P. (1993). Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1609–1611.
- Rose, C., Peoc'h, K., Chasseigneaux, S., Paquet, C., Dumurgier, J., Bourasset, F., Calon, F., Laplanche, J.-L., Hugon, J., and Allinquant, B. (2012). New highly sensitive rodent and human tests for soluble amyloid precursor protein alpha quantification: preclinical and clinical applications in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci* 13, 84.
- Rosen, W.G., Mohs, R.C., and Davis, K.L. (1984). A new rating scale for Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 141, 1356–1364.
- Rosenberg, G.A. (2009). Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol* 8, 205–216.
- Ross, R. (1993). Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am. J. Pathol.* 143, 987–1002.
- Rossi, L., Mazzitelli, S., Arciello, M., Capo, C.R., and Rotilio, G. (2008). Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 33, 2390–2400.
- Roth, M., Tomlinson, B.E., and Blessed, G. (1967). The relationship between quantitative measures of dementia and of degenerative changes in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Proc R Soc Med* 60, 254–260.
- Rowe, J.W., and Kahn, R.L. (1997). Successful aging. *Gerontologist* 37, 433–440.
- Sabo, S.L., Ikin, A.F., Buxbaum, J.D., and Greengard, P. (2003). The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* 23, 5407–5415.
- Sacks, F.M., and Katan, M. (2002). Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. *Am. J. Med.* 113 Suppl 9B, 13S–24S.
- Sadovsky, R., and Kris-Etherton, P. (2009). Prescription Omega-3-Acid Ethyl Esters for the Treatment of Very High Triglycerides. *Postgraduate Medicine* 121, 145–153.
- Sae-tan, S., Grove, K.A., and Lambert, J.D. (2011). Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea. *Pharmacological Research* 64, 146–154.

- Sahlin, C., Pettersson, F.E., Nilsson, L.N.G., Lannfelt, L., and Johansson, A.-S. (2007). Docosahexaenoic acid stimulates non-amyloidogenic APP processing resulting in reduced Abeta levels in cellular models of Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurosci.* *26*, 882–889.
- Saiz, L., and Klein, M.L. (2001). Structural properties of a highly polyunsaturated lipid bilayer from molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* *81*, 204–216.
- Sakamoto, T., Cansev, M., and Wurtman, R.J. (2007). Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus. *Brain Res.* *1182*, 50–59.
- Sakayori, N., Maekawa, M., Numayama-Tsuruta, K., Katura, T., Moriya, T., and Osumi, N. (2011). Distinctive effects of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on neural stem/progenitor cells. *Genes Cells* *16*, 778–790.
- Salem, N., Jr, Litman, B., Kim, H.Y., and Gawrisch, K. (2001). Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* *36*, 945–959.
- Salmon, A.B., Richardson, A., and Pérez, V.I. (2010). Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radic. Biol. Med.* *48*, 642–655.
- Sands, S.A., Reid, K.J., Windsor, S.L., and Harris, W.S. (2005). The impact of age, body mass index, and fish intake on the EPA and DHA content of human erythrocytes. *Lipids* *40*, 343–347.
- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesì, C., and Masella, R. (2007). Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann. Ist. Super. Sanita* *43*, 394–405.
- Sastry, P.S. (1985). Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog. Lipid Res.* *24*, 69–176.
- Saw, C.L.L., Huang, Y., and Kong, A.-N. (2010). Synergistic anti-inflammatory effects of low doses of curcumin in combination with polyunsaturated fatty acids: Docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid. *Biochemical Pharmacology* *79*, 421–430.
- Scalbert, A., and Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* *130*, 2073S–85S.
- Scarmeas, N., Stern, Y., Tang, M.-X., Mayeux, R., and Luchsinger, J.A. (2006). Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* *59*, 912–921.
- Schaefer, E.J., Bongard, V., Beiser, A.S., Lamon-Fava, S., Robins, S.J., Au, R., Tucker, K.L., Kyle, D.J., Wilson, P.W.F., and Wolf, P.A. (2006). Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. *Arch. Neurol.* *63*, 1545–1550.
- Schantz, S.L., Gasior, D.M., Polverejan, E., McCaffrey, R.J., Sweeney, A.M., Humphrey, H.E., and Gardiner, J.C. (2001). Impairments of memory and learning in older adults exposed to polychlorinated biphenyls via consumption of Great Lakes fish. *Environ. Health Perspect.* *109*, 605–611.
- Scharf, S., Mander, A., Ugoni, A., Vajda, F., and Christophidis, N. (1999). A double-blind, placebo-controlled trial of diclofenac/misoprostol in Alzheimer's disease. *Neurology* *53*, 197–201.
- Scheen, A.J. (2003). Pathophysiology of type 2 diabetes. *Acta Clin Belg* *58*, 335–341.
- Scheen, A.J. (2005). Diabetes mellitus in the elderly: insulin resistance and/or impaired insulin secretion? *Diabetes Metab. 31 Spec No 2*, 5S27–25S34.
- Scheff, S.W., Price, D.A., Schmitt, F.A., DeKosky, S.T., and Mufson, E.J. (2007). Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* May 1, 2007 *68*, 1501–1508.
- Schell, L.M., and Gallo, M.V. (2010). Relationships of putative endocrine disruptors to human sexual maturation and thyroid activity in youth. *Physiol. Behav.* *99*, 246–253.
- Schell, L.M., Gallo, M.V., Denham, M., and Ravenscroft, J. (2006). Effects of pollution on human growth and development: an introduction. *J Physiol Anthropol* *25*, 103–112.
- Schell, L.M., Burnitz, K.K., and Lathrop, P.W. (2010). Pollution and human biology. *Ann. Hum. Biol.* *37*, 347–366.
- Schmitz, G., and Ecker, J. (2008). The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog. Lipid Res.* *47*, 147–155.
- Schreurs, B.G. (2010). The effects of cholesterol on learning and memory. *Neurosci Biobehav Rev* *34*, 1366–1379.
- Schroeter, H., Bahia, P., Spencer, J.P.E., Sheppard, O., Rattray, M., Cadenas, E., Rice-Evans, C., and Williams, R.J. (2007). (-)Epicatechin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and up-regulates GluR2 in cortical neurons. *J. Neurochem.* *101*, 1596–1606.
- Schroeter, H., Spencer, J.P., Rice-Evans, C., and Williams, R.J. (2001). Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem. J.* *358*, 547–557.
- Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J.P.E., Williams, R.J., Cadenas, E., and Rice-Evans, C. (2002). MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol. Aging* *23*, 861–880.
- Seabrook, G.R., Smith, D.W., Bowery, B.J., Easter, A., Reynolds, T., Fitzjohn, S.M., Morton, R.A., Zheng, H., Dawson, G.R., Sirinathsinghi, D.J., et al. (1999). Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology* *38*, 349–359.
- Seebungkert, B., and Lynch, J.W. (2002). Effects of polyunsaturated fatty acids on voltage-gated K⁺ and Na⁺ channels in rat olfactory receptor neurons. *Eur. J. Neurosci.* *16*, 2085–2094.
- Seeley, R.R., Stephens, T.D., and Tate, P. (2003). *MP: Anatomy & Physiology*, 6/e with OLC bind-in card (McGraw-Hill).
- Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* *81*, 741–766.
- Selkoe, D.J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure: The dynamic synapse. *Science* *298*, 789–791.
- Seo, A.Y., Joseph, A.-M., Dutta, D., Hwang, J.C.Y., Aris, J.P., and Leeuwenburgh, C. (2010). New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J. Cell. Sci.* *123*, 2533–2542.
- Semeels, L., Van Biervliet, J., Craessaerts, K., Dejaegere, T., Horré, K., Van Houtvin, T., Esselmann, H., Paul, S., Schäfer, M.K., Berezovska, O., et al. (2009). gamma-Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer's disease. *Science* *324*, 639–642.
- Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M., and Barnes, S. (1997). Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J. Nutr.* *127*, 1260–1268.
- Shahpasand, K., Uemura, I., Saito, T., Asano, T., Hata, K., Shibata, K., Toyoshima, Y., Hasegawa, M., and Hisanaga, S.-I. (2012). Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* *32*, 2430–2441.
- Shaikh, S.R., Dumaul, A.C., Castillo, A., LoCascio, D., Siddiqui, R.A., Stillwell, W., and Wassall, S.R. (2004). Oleic and docosahexaenoic acid differentially phase separate from lipid raft molecules: a comparative NMR, DSC, AFM, and detergent extraction study. *Biophys. J.* *87*, 1752–1766.
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., et al. (2008). Amyloid-beta protein dimers

- isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* *14*, 837–842.
- Sharma, S., Zhuang, Y., and Gomez-Pinilla, F. (2012). High-fat diet transition reduces brain DHA levels associated with altered brain plasticity and behaviour. *Sci Rep* *2*, 431.
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., and Zimmet, P.Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *87*, 4–14.
- Shay, J.W., and Wright, W.E. (2011). Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin. Cancer Biol.* *21*, 349–353.
- Sheng, R., Gu, Z.-L., and Xie, M.-L. (2011). Epigallocatechin gallate, the major component of polyphenols in green tea, inhibits telomere attrition mediated cardiomyocyte apoptosis in cardiac hypertrophy. *Int. J. Cardiol.*
- Shi, Y., and Burn, P. (2004). Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nat Rev Drug Discov* *3*, 695–710.
- Shie, F.-S., Jin, L.-W., Cook, D.G., Leverenz, J.B., and LeBoeuf, R.C. (2002). Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* *13*, 455–459.
- Shimazawa, M., Nakajima, Y., Mashima, Y., and Hara, H. (2009). Docosahexaenoic acid (DHA) has neuroprotective effects against oxidative stress in retinal ganglion cells. *Brain Res.* *1251*, 269–275.
- Shimmyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T., and Sugimoto, H. (2008a). Epigallocatechin-3-gallate and curcumin suppress amyloid beta-induced beta-site APP cleaving enzyme-1 upregulation. *Neuroreport* *19*, 1329–1333.
- Shimmyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T., and Sugimoto, H. (2008b). Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: structure-activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. *Biochim. Biophys. Acta* *1780*, 819–825.
- Shimmyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T., and Sugimoto, H. (2008c). Multifunction of myricetin on A beta: neuroprotection via a conformational change of A beta and reduction of A beta via the interference of secretases. *J. Neurosci. Res.* *86*, 368–377.
- Shinohara, M., Sato, N., Kurinami, H., Takeuchi, D., Takeda, S., Shimamura, M., Yamashita, T., Uchiyama, Y., Rakugi, H., and Morishita, R. (2010). Reduction of brain beta-amyloid (A β) by fluvastatin, a hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor, through increase in degradation of amyloid precursor protein C-terminal fragments (APP-CTFs) and A β clearance. *J. Biol. Chem.* *285*, 22091–22102.
- Shipton, O.A., Leitz, J.R., Dworzak, J., Acton, C.E.J., Tunbridge, E.M., Denk, F., Dawson, H.N., Vitek, M.P., Wade-Martins, R., Paulsen, O., et al. (2011). Tau protein is required for amyloid β -induced impairment of hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* *31*, 1688–1692.
- Shirai, N., and Suzuki, H. (2004). Effect of dietary docosahexaenoic acid and catechins on maze behavior in mice. *Annals of Nutrition and Metabolism* *48*, 51–58.
- Shirai, N., and Suzuki, H. (2008). Effects of simultaneous intakes of fish oil and green tea extracts on plasma, glucose, insulin, c-peptide, and adiponectin and on liver lipid concentrations in mice fed low- and high-fat diets. *Annals of Nutrition and Metabolism* *52*, 241–249.
- Shobab, L.A., Hsiung, G.-Y.R., and Feldman, H.H. (2005). Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* *4*, 841–852.
- Shoji, H., Franke, C., Demmelmair, H., and Koletzko, B. (2009). Effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress in placental trophoblast cells. *Early Hum. Dev.* *85*, 433–437.
- Shukitt-Hale, B., Lau, F.C., and Joseph, J.A. (2008). Berry fruit supplementation and the aging brain. *J. Agric. Food Chem.* *56*, 636–641.
- Siener, R., Alteheld, B., Terjung, B., Junghans, B., Bitterlich, N., Stehle, P., and Metzner, C. (2010). Change in the fatty acid pattern of erythrocyte membrane phospholipids after oral supplementation of specific fatty acids in patients with gastrointestinal diseases. *Eur J Clin Nutr* *64*, 410–418.
- Silveira e Souza, A.M.M., Mazucato, V.M., Jamur, M.C., and Oliver, C. (2011). Lipid Rafts in Mast Cell Biology. *Journal of Lipids* *2011*, 1–11.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* *387*, 569–572.
- Simopoulos, A.P. (2011). Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol. Neurobiol.* *44*, 203–215.
- Simopoulos, A.P., Leaf, A., and Salem, N., Jr (2000). Workshop statement on the essentiality of and recommended dietary intakes for Omega-6 and Omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *63*, 119–121.
- Sinha, S., and Lieberburg, I. (1999). Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 11049–11053.
- Sjögren, M., Davidsson, P., Wallin, A., Granérus, A.-K., Grundström, E., Askmark, H., Vanmechelen, E., and Blennow, K. (2002). Decreased CSF-beta-amyloid 42 in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis may reflect mismetabolism of beta-amyloid induced by disparate mechanisms. *Dement Geriatr Cogn Disord* *13*, 112–118.
- Skinner, E.R., Watt, C., Besson, J.A., and Best, P.V. (1993). Differences in the fatty acid composition of the grey and white matter of different regions of the brains of patients with Alzheimer's disease and control subjects. *Brain* *116 (Pt 3)*, 717–725.
- Skoog, I., Lernfelt, B., Landahl, S., Palmertz, B., Andreasson, L.A., Nilsson, L., Persson, G., Odén, A., and Svanborg, A. (1996). 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *Lancet* *347*, 1141–1145.
- Skulas-Ray, A.C., Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Heuvel, J.P.V., Wagner, P.R., and West, S.G. (2011). Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. *Am J Clin Nutr* *93*, 243–252.
- Slivka, A., Spina, M.B., and Cohen, G. (1987). Reduced and oxidized glutathione in human and monkey brain. *Neurosci. Lett.* *74*, 112–118.
- Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A., and Markesbery, W.R. (1991). Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 10540–10543.
- Smith, M.A., Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Raina, A.K., and Perry, G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1502*, 139–144.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* *150*, 76–85.
- Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Löwer, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., et al. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J.* *24*, 3624–3634.
- Söderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K., and Dallner, G. (1991). Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids* *26*, 421–425.
- Søgaard, R., Werge, T.M., Bertelsen, C., Lundbye, C., Madsen,

- K.L., Nielsen, C.H., and Lundbaek, J.A. (2006). GABA(A) receptor function is regulated by lipid bilayer elasticity. *Biochemistry* 45, 13118–13129.
- Sohal, R.S., and Orr, W.C. (2012). The redox stress hypothesis of aging. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 539–555.
- Sohal, R.S., and Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273, 59–63.
- Solomon, A., Kivipelto, M., Wolozin, B., Zhou, J., and Whitmer, R.A. (2009). Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement Geriatr Cogn Disord* 28, 75–80.
- Spencer, J.P.E. (2008). Flavonoids: modulators of brain function? *Br. J. Nutr.* 99 E Suppl 1, ES60–77.
- Spencer, J.P.E., Vauzour, D., and Rendeiro, C. (2009). Flavonoids and cognition: the molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Arch. Biochem. Biophys.* 492, 1–9.
- Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack, C.R., Jr, Kaye, J., Montine, T.J., et al. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 280–292.
- Spiriduso, W.W. (1975). Reaction and movement time as a function of age and physical activity level. *J Gerontol* 30, 435–440.
- Sponne, I., Fifre, A., Drouet, B., Klein, C., Koziel, V., Pinçon-Raymond, M., Olivier, J.-L., Chambaz, J., and Pillot, T. (2003). Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid-beta peptide proceeds through an early reactive oxygen species-dependent cytoskeleton perturbation. *J. Biol. Chem.* 278, 3437–3445.
- Sponne, I., Fifre, A., Koziel, V., Oster, T., Olivier, J.L., and Pillot, T. (2004). Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of amyloid-beta peptide. *FASEB J.* 18, 836–838.
- Stadtman, E.R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science* 257, 1220–1224.
- Stampfer, M.J. (2006). Cardiovascular disease and Alzheimer's disease: common links. *J. Intern. Med.* 260, 211–223.
- Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr, Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92, 1355–1374.
- Steffener, J., and Stern, Y. (2012). Exploring the neural basis of cognitive reserve in aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 467–473.
- Stein, T.D., Anders, N.J., DeCarli, C., Chan, S.L., Mattson, M.P., and Johnson, J.A. (2004). Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J. Neurosci.* 24, 7707–7717.
- Stern, Y. (2002). What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. *J Int Neuropsychol Soc* 8, 448–460.
- Stern, Y. (2006). Cognitive reserve and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 20, S69–74.
- Stern, Y. (2009). Cognitive reserve. *Neuropsychologia* 47, 2015–2028.
- Stern, Y., Gurland, B., Tatemichi, T.K., Tang, M.X., Wilder, D., and Mayeux, R. (1994). Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA* 271, 1004–1010.
- Stewart, P.W., Reihman, J., Lonky, E., and Pagano, J. (2012). Issues in the interpretation of associations of PCBs and IQ. *Neurotoxicol Teratol* 34, 96–107.
- Stillwell, W., and Wassall, S.R. (2003). Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem. Phys. Lipids* 126, 1–27.
- Stokin, G.B., Lillo, C., Falzone, T.L., Bruschi, R.G., Rockenstein, E., Mount, S.L., Raman, R., Davies, P., Masliah, E., Williams, D.S., et al. (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307, 1282–1288.
- Stough, C., Downey, L., Silber, B., Lloyd, J., Kure, C., Wesnes, K., and Camfield, D. (2012). The effects of 90-day supplementation with the Omega-3 essential fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) on cognitive function and visual acuity in a healthy aging population. *Neurobiology of Aging* 33, 824.e1–824.e3.
- Streit, W.J. (2004). Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neurosci. Res.* 77, 1–8.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1977–1981.
- Strokin, M., Sergeeva, M., and Reiser, G. (2003). Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca²⁺. *Br. J. Pharmacol.* 139, 1014–1022.
- De Strooper, B., and Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 11), 1857–1870.
- De Strooper, B., Vassar, R., and Golde, T. (2010). The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6, 99–107.
- De Strooper, B., Iwatsubo, T., and Wolfe, M.S. (2012). Presenilins and γ -Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006304.
- Strozyk, D., Blennow, K., White, L.R., and Launer, L.J. (2003). CSF A β 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology* 60, 652–656.
- Su, H.-M. (2010). Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J. Nutr. Biochem.* 21, 364–373.
- Suh, J.-H., Virsolvy, A., Goux, A., Cassan, C., Richard, S., Cristol, J.-P., Teissèdre, P.-L., and Rouanet, J.-M. (2011). Polyphenols prevent lipid abnormalities and arterial dysfunction in hamsters on a high-fat diet: a comparative study of red grape and white persimmon wines. *Food Funct* 2, 555–561.
- Sultana, R., Banks, W.A., and Butterfield, D.A. (2010). Decreased levels of PSD95 and two associated proteins and increased levels of BCL2 and caspase 3 in hippocampus from subjects with amnesic mild cognitive impairment: Insights into their potential roles for loss of synapses and memory, accumulation of A β , and neurodegeneration in a prodromal stage of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 88, 469–477.
- Sultana, R., Perluigi, M., and Butterfield, D.A. (2012). Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: A redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic Biol Med.* doi:pii: S0891-5849(12)01161-6.
- Sun, C., Wei, Z., and Li, Y. (2011). DHA regulates lipogenesis and lipolysis genes in mice adipose and liver. *Mol. Biol. Rep.* 38, 731–737.
- Sun, S., Pan, S., Caijin, L., Miao, A., Pang, S., Lai, Z., Chen, D.,

- and Zhao, C. (2012). Free radical scavenging abilities in vitro and antioxidant activities in vivo of black tea and its main polyphenols. *Journal of Medicinal Plants Research* 6.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et al. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441–446.
- Suzuki, H., Manabe, S., Wada, O., and Crawford, M.A. (1997). Rapid incorporation of docosahexaenoic acid from dietary sources into brain microsomal, synaptosomal and mitochondrial membranes in adult mice. *Int J Vitam Nutr Res* 67, 272–278.
- Tabaton, M., and Piccini, A. (2005). Role of water-soluble amyloid-beta in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Int J Exp Pathol* 86, 139–145.
- Takechi, R., Galloway, S., Pallegage-Gamarallage, M.M., Lam, V., and Mamo, J.C. (2010a) Dietary fats, cerebrovasculature integrity and Alzheimer's disease risk. *Prog Lipid Res.* 49, 159–170.
- Takechi, R., Galloway, S., Pallegage-Gamarallage, M.M., Wellington, C.L., Johnsen, R.D., Dhaliwal, S.S., and Mamo, J.C. (2010b) Differential effects of dietary fatty acids on the cerebral distribution of plasma-derived apo B lipoproteins with amyloid-beta. *Br J Nutr.* 103, 652–662.
- Tan, Z.S., Seshadri, S., Beiser, A., Wilson, P.W.F., Kiel, D.P., Tocco, M., D'Agostino, R.B., and Wolf, P.A. (2003). Plasma total cholesterol level as a risk factor for Alzheimer disease: the Framingham Study. *Arch. Intern. Med.* 163, 1053–1057.
- Tan, Z.S., Beiser, A.S., Vasan, R.S., Roubenoff, R., Dinarello, C.A., Harris, T.B., Benjamin, E.J., Au, R., Kiel, D.P., Wolf, P.A., et al. (2007). Inflammatory markers and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study. *Neurology* 68, 1902–1908.
- Tan, Z.S., Harris, W.S., Beiser, A.S., Au, R., Himali, J.J., Debette, S., Pikula, A., DeCarli, C., Wolf, P.A., Vasan, R.S., et al. (2012). Red blood cell omega-3 fatty acid levels and markers of accelerated brain aging. *Neurology* 78, 658–664.
- Tang, X., Li, Z.-J., Xu, J., Xue, Y., Li, J.-Z., Wang, J.-F., Yanagita, T., Xue, C.-H., and Wang, Y.-M. (2012). Short term effects of different omega-3 fatty acid formulation on lipid metabolism in mice fed high or low fat diet. *Lipids in Health and Disease* 11, 70.
- Tatar, M., Bartke, A., and Antebi, A. (2003). The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299, 1346–1351.
- Taylor, C.J., Ireland, D.R., Ballagh, I., Bourne, K., Marechal, N.M., Turner, P.R., Bilkey, D.K., Tate, W.P., and Abraham, W.C. (2008). Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol. Dis.* 31, 250–260.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., and Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 30, 572–580.
- Tessier, F.J. (2010). The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol. Biol.* 58, 214–219.
- Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58, 1791–1800.
- Thompson, P.D., Buchner, D., Pina, I.L., Balady, G.J., Williams, M.A., Marcus, B.H., Berra, K., Blair, S.N., Costa, F., Franklin, B., et al. (2003). Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation* 107, 3109–3116.
- van Thriel, C., Westerink, R.H.S., Beste, C., Bale, A.S., Lein, P.J., and Leist, M. (2011). Translating neurobehavioural endpoints of developmental neurotoxicity tests into in vitro assays and readouts. *Neurotoxicology*.
- Thusgaard, M., Christensen, J.H., Mørn, B., Andersen, T.S., Vige, R., Arildsen, H., Schmidt, E.B., and Nielsen, H. (2009). Effect of fish oil (n-3 polyunsaturated fatty acids) on plasma lipids, lipoproteins and inflammatory markers in HIV-infected patients treated with antiretroviral therapy: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 41, 760–766.
- Tian, Y., Crump, C.J., and Li, Y.-M. (2010). Dual role of alpha-secretase cleavage in the regulation of gamma-secretase activity for amyloid production. *J. Biol. Chem.* 285, 32549–32556.
- Tobert, J.A. (2003). Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2, 517–526.
- Tofighi, R., Wan Ibrahim, W.N., Rebellato, P., Andersson, P.L., Uhlén, P., and Ceccatelli, S. (2011). Non-dioxin-like polychlorinated biphenyls interfere with neuronal differentiation of embryonic neural stem cells. *Toxicol. Sci.* 124, 192–201.
- Tomás-Barberán, F.A., and Clifford, M.N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agri.* 80, 1024–1032.
- Tosato, M., Zamboni, V., Ferrini, A., and Cesari, M. (2007). The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clin Interv Aging* 2, 401–412.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350–4354.
- Trevisan, M., Browne, R., Ram, M., Muti, P., Freudenheim, J., Carosella, A.M., and Armstrong, D. (2001). Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am. J. Epidemiol.* 154, 348–356.
- Trivalle, C. (2004). Vieillesse normale : mythe ou réalité? *La Revue du praticien. Médecine générale* 1263–1266.
- Tsuda, M., Kitazaki, T., and Imai, Y. (1983). Changes in the profiles of rodent plasma lipoproteins and apolipoproteins after cholesterol feeding. *J. Biochem.* 93, 1071–1077.
- Tucker, H.M., Kihiko-Ehmann, M., Wright, S., Rydel, R.E., and Estus, S. (2000). Tissue plasminogen activator requires plasminogen to modulate amyloid-beta neurotoxicity and deposition. *J. Neurochem.* 75, 2172–2177.
- Tully, A.M., Roche, H.M., Doyle, R., Fallon, C., Bruce, I., Lawlor, B., Coakley, D., and Gibney, M.J. (2003). Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: a case-control study. *Br. J. Nutr.* 89, 483–489.
- Tzourio, C., Dufouil, C., Ducimetière, P., and Alperovitch, A. (1999). Cognitive decline in individuals with high blood pressure: a longitudinal study in the elderly. EVA Study Group. *Epidemiology of Vascular Aging. Neurology* 53, 1948–1952.
- Tzourio, C., Anderson, C., Chapman, N., Woodward, M., Neal, B., MacMahon, S., and Chalmers, J. (2003). Effects of blood pressure lowering with perindopril and indapamide therapy on dementia and cognitive decline in patients with cerebrovascular disease. *Arch. Intern. Med.* 163, 1069–1075.
- Ueda, M., and Ashida, H. (2012). Green Tea Prevents Obesity by Increasing Expression of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1 in Adipose Tissue of High-Fat Diet-Fed Mice. *J. Agric. Food Chem.* 60, 8917–8923.
- Ulmann, L., Mimouni, V., Roux, S., Porsolt, R., and Poisson, J.P. (2001). Brain and hippocampus fatty acid composition in phospholipid classes of aged-relative cognitive deficit rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 64, 189–195.

- Umhau, J.C., Zhou, W., Carson, R.E., Rapoport, S.I., Polozova, A., Demar, J., Hussein, N., Bhattacharjee, A.K., Ma, K., Esposito, G., et al. (2009). Imaging incorporation of circulating docosahexaenoic acid into the human brain using positron emission tomography. *J. Lipid Res.* *50*, 1259–1268.
- Vafa, M.R., Haghighatjoo, E., Shidfar, F., Afshari, S., Gohari, M.R., and Ziaee, A. (2011). Effects of apple consumption on lipid profile of hyperlipidemic and overweight men. *Int J Prev Med* *2*, 94–100.
- Valente, T., Hidalgo, J., Bolea, I., Ramirez, B., Anglés, N., Reguant, J., Morelló, J.R., Gutiérrez, C., Boada, M., and Unzeta, M. (2009). A diet enriched in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, LMN diet, induces neurogenesis in the subventricular zone and hippocampus of adult mouse brain. *J. Alzheimers Dis.* *18*, 849–865.
- Valenzuela, A., Nieto, S., Sanhueza, J., Nuñez, M.J., and Ferrer, C. (2005a). Tissue accretion and milk content of docosahexaenoic acid in female rats after supplementation with different docosahexaenoic acid sources. *Ann. Nutr. Metab.* *49*, 325–332.
- Valenzuela, A., Valenzuela, V., Sanhueza, J., and Nieto, S. (2005b). Effect of supplementation with docosahexaenoic acid ethyl ester and sn-2 docosahexaenyl monoacylglyceride on plasma and erythrocyte fatty acids in rats. *Ann. Nutr. Metab.* *49*, 49–53.
- Valls-Pedret, C., Lamuela-Raventós, R.M., Medina-Remón, A., Quintana, M., Corella, D., Pintó, X., Martínez-González, M.Á., Estruch, R., and Ros, E. (2012). Polyphenol-rich foods in the Mediterranean diet are associated with better cognitive function in elderly subjects at high cardiovascular risk. *J. Alzheimers Dis.* *29*, 773–782.
- Varadarajan, S., Yatin, S., Aksenova, M., and Butterfield, D.A. (2000). Review: Alzheimer's Amyloid β -Peptide-Associated Free Radical Oxidative Stress and Neurotoxicity. *Journal of Structural Biology* *130*, 184–208.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiáz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., et al. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* *286*, 735–741.
- Vassar, R., Kovacs, D.M., Yan, R., and Wong, P.C. (2009). The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J. Neurosci.* *29*, 12787–12794.
- Vauzour, D. (2012). Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxid Med Cell Longev* *2012*, 914273.
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rice-Evans, C., Williams, R.J., and Spencer, J.P.E. (2007). Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *J. Neurochem.* *103*, 1355–1367.
- Venkateshappa, C., Harish, G., Mahadevan, A., Srinivas Bharath, M.M., and Shankar, S.K. (2012). Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* *37*, 1601–1614.
- Vercambre, M.-N., Boutron-Ruault, M.-C., Ritchie, K., Clavel-Chapelon, F., and Berr, C. (2009). Long-term association of food and nutrient intakes with cognitive and functional decline: a 13-year follow-up study of elderly French women. *Br. J. Nutr.* *102*, 419–427.
- Verstraeten, S.V., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Fraga, C.G., and Oteiza, P.I. (2003). Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radic. Biol. Med.* *34*, 84–92.
- Vetrivel, K.S., Zhang, Y., Xu, H., and Thinakaran, G. (2006). Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener* *1*, 4.
- Vibet, S., Goupille, C., Bougnoux, P., Steghens, J.-P., Goré, J., and Mahéo, K. (2008). Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response. *Free Radic. Biol. Med.* *44*, 1483–1491.
- Viola, A., and Gupta, N. (2007). Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 889–896.
- Visioli, F., Risé, P., Barassi, M.C., Marangoni, F., and Galli, C. (2003). Dietary intake of fish vs. formulations leads to higher plasma concentrations of n-3 fatty acids. *Lipids* *38*, 415–418.
- Viswanathan, A., and Greenberg, S.M. (2011). Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Ann. Neurol.* *70*, 871–880.
- Vita, J.A. (2005). Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am. J. Clin. Nutr.* *81*, 292S–297S.
- Vreugdenhil, H.J.I., Lanting, C.I., Mulder, P.G.H., Boersma, E.R., and Weisglas-Kuperus, N. (2002). Effects of prenatal PCB and dioxin background exposure on cognitive and motor abilities in Dutch children at school age. *J. Pediatr.* *140*, 48–56.
- Vreugdenhil, M., Bruehl, C., Voskuyl, R.A., Kang, J.X., Leaf, A., and Wadman, W.J. (1996). Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 12559–12563.
- Waldemar, G., Dubois, B., Emre, M., Georges, J., McKeith, I.G., Rossor, M., Scheltens, P., Tariska, P., and Winblad, B. (2007). Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *Eur. J. Neurol.* *14*, e1–26.
- Wallace, D.C. (1994). Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 8739–8746.
- Walsh, D.M., Hartley, D.M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Selkoe, D.J., and Teplow, D.B. (1999). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J. Biol. Chem.* *274*, 25945–25952.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* *416*, 535–539.
- Walsh, D.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Condron, M.M., and Teplow, D.B. (1997). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol. Chem.* *272*, 22364–22372.
- Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2004). Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* *44*, 181–193.
- Wang, J.F., Schramm, D.D., Holt, R.R., Ensunsa, J.L., Fraga, C.G., Schmitz, H.H., and Keen, C.L. (2000). A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J. Nutr.* *130*, 2115S–9S.
- Wang, P., Yang, G., Mosier, D.R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y.-D., Zhao, N.-M., Dominguez, B., Lee, K.-F., Gan, W.-B., et al. (2005). Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J. Neurosci.* *25*, 1219–1225.
- Wang, C., Harris, W.S., Chung, M., Lichtenstein, A.H., Balk, E.M., Kupelnick, B., Jordan, H.S., and Lau, J. (2006a). n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and

- secondary-prevention studies: a systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* *84*, 5–17.
- Wang, D.-S., Dickson, D.W., and Malter, J.S. (2006b). beta-Amyloid degradation and Alzheimer's disease. *J. Biomed. Biotechnol.* *2006*, 58406.
- Wang, W., Shinto, L., Connor, W.E., and Quinn, J.F. (2008). Nutritional Biomarkers in Alzheimer's Disease: The Association between Carotenoids, n-3 Fatty Acids, and Dementia Severity. *Journal of Alzheimer's Disease* *13*, 31–38.
- Wang, Z., Wang, B., Yang, L., Guo, Q., Aithmitti, N., Songyang, Z., and Zheng, H. (2009). Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis. *J. Neurosci.* *29*, 10788–10801.
- Wang, H.-H., Li, H.-L., Liu, R., Zhang, Y., Liao, K., Wang, Q., Wang, J.-Z., and Liu, S.-J. (2010a). Tau overexpression inhibits cell apoptosis with the mechanisms involving multiple viability-related factors. *J. Alzheimers Dis.* *21*, 167–179.
- Wang, S., Wang, R., Chen, L., Bennett, D.A., Dickson, D.W., and Wang, D.-S. (2010b). Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain. *J. Neurochem.* *115*, 47–57.
- Wassall, S.R., and Stillwell, W. (2008). Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain. *Chem. Phys. Lipids* *153*, 57–63.
- Wassall, S.R., and Stillwell, W. (2009). Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 24–32.
- Whalley, L.J., Deary, I.J., Starr, J.M., Wahle, K.W., Rance, K.A., Bourne, V.J., and Fox, H.C. (2008). n-3 Fatty acid erythrocyte membrane content, APOE varepsilon4, and cognitive variation: an observational follow-up study in late adulthood. *Am. J. Clin. Nutr.* *87*, 449–454.
- Whitmer, R.A., Gunderson, E.P., Barrett-Connor, E., Quesenberry, C.P., Jr, and Yaffe, K. (2005). Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *BMJ* *330*, 1360.
- Wijendran, V., Huang, M.-C., Diao, G.-Y., Boehm, G., Nathanielsz, P.W., and Brenna, J.T. (2002). Efficacy of dietary arachidonic acid provided as triglyceride or phospholipid as substrates for brain arachidonic acid accretion in baboon neonates. *Pediatr. Res.* *51*, 265–272.
- Willcox, B.J., Willcox, D.C., Todoriki, H., Fujiyoshi, A., Yano, K., He, Q., Curb, J.D., and Suzuki, M. (2007). Caloric restriction, the traditional Okinawan diet, and healthy aging: the diet of the world's longest-lived people and its potential impact on morbidity and life span. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1114*, 434–455.
- Williams, K.J. (2008). Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids. *J. Clin. Invest.* *118*, 3247–3259.
- Williams, C.M., and Burdge, G. (2006). Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. *Proc Nutr Soc* *65*, 42–50.
- Williams, R.J., and Spencer, J.P.E. (2012). Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.* *52*, 35–45.
- Williams, R.J., Spencer, J.P.E., and Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* *36*, 838–849.
- Williams, J.A., Batten, S.E., Harris, M., Rockett, B.D., Shaikh, S.R., Stillwell, W., and Wassall, S.R. (2012). Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Acids Segregate Differently between Raft and Nonraft Domains. *Biophys. J.* *103*, 228–237.
- Wirdefeldt, K., Adami, H.-O., Cole, P., Trichopoulos, D., and Mandel, J. (2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur. J. Epidemiol.* *26 Suppl 1*, S1–58.
- Witte, A.V., Fobker, M., Gellner, R., Knecht, S., and Flöel, A. (2009). Caloric restriction improves memory in elderly humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 1255–1260.
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G., and Siegel, G. (2000). Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* *57*, 1439–1443.
- Wong, L.S.M., van der Harst, P., de Boer, R.A., Huzen, J., van Gilst, W.H., and van Veldhuisen, D.J. (2010). Aging, telomeres and heart failure. *Heart Fail Rev* *15*, 479–486.
- Wu, A., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2004). Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J. Neurotrauma* *21*, 1457–1467.
- Wu, A., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2008). Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Neuroscience* *155*, 751–759.
- Wu, H., Ichikawa, S., Tani, C., Zhu, B., Tada, M., Shimoishi, Y., Murata, Y., and Nakamura, Y. (2009). Docosahexaenoic acid induces ERK1/2 activation and neurogenesis via intracellular reactive oxygen species production in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1791*, 8–16.
- Wurtman, R.J., Cansev, M., and Ulus, I.H. (2009). Synapse formation is enhanced by oral administration of uridine and DHA, the circulating precursors of brain phosphatides. *J Nutr Health Aging* *13*, 189–197.
- Ximenes da Silva, A., Lavalie, F., Gendrot, G., Guesnet, P., Alessandri, J.-M., and Lavalie, M. (2002). Glucose transport and utilization are altered in the brain of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Neurochem.* *81*, 1328–1337.
- Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Walker, D.G., Lue, L.-F., Beach, T.G., Sue, L.I., Woulfe, J., Xu, H., Stanimirovic, D.B., et al. (2008). Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production. *Neurobiol. Dis.* *29*, 422–437.
- Xu, X., Yang, D., Wyss-Coray, T., Yan, J., Gan, L., Sun, Y., and Mucke, L. (1999). Wild-type but not Alzheimer-mutant amyloid precursor protein confers resistance against p53-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 7547–7552.
- Xu, W.L., Atti, A.R., Gatz, M., Pedersen, N.L., Johansson, B., and Fratiglioni, L. (2011). Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: A population-based twin study. *Neurology* May 3, 2011 *76*, 1568–1574.
- Yaffe, K., Barnes, D., Nevitt, M., Lui, L.Y., and Covinsky, K. (2001). A prospective study of physical activity and cognitive decline in elderly women: women who walk. *Arch. Intern. Med.* *161*, 1703–1708.
- Yaffe, K., Barrett-Connor, E., Lin, F., and Grady, D. (2002). Serum lipoprotein levels, statin use, and cognitive function in older women. *Arch. Neurol.* *59*, 378–384.
- Yaffe, K., Vittinghoff, E., Lindquist, K., Barnes, D., Covinsky, K.E., Neylan, T., Kluse, M., and Marmar, C. (2010). Posttraumatic stress disorder and risk of dementia among US veterans. *Arch. Gen. Psychiatry* *67*, 608–613.
- Yamashima, T. (2012). "PUFA-GPR40-CREB signaling" hypothesis for the adult primate neurogenesis. *Prog. Lipid Res.* *51*, 221–231.
- Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., et al. (1996). RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* *382*, 685–691.

- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., et al. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533–537.
- Yan, J.J., Cho, J.Y., Kim, H.S., Kim, K.L., Jung, J.S., Huh, S.O., Suh, H.W., Kim, Y.H., and Song, D.K. (2001). Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *Br. J. Pharmacol.* 133, 89–96.
- Yang, L.Y., Kuksis, A., and Myher, J.J. (1990). Lipolysis of menhaden oil triacylglycerols and the corresponding fatty acid alkyl esters by pancreatic lipase in vitro: a reexamination. *J. Lipid Res.* 31, 137–147.
- Yao, J., Wang, J.-Y., Liu, L., Li, Y.-X., Xun, A.-Y., Zeng, W.-S., Jia, C.-H., Wei, X.-X., Feng, J.-L., Zhao, L., et al. (2010). Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Arch. Med. Res.* 41, 288–294.
- Yaqoob, P. (2009). The nutritional significance of lipid rafts. *Annu. Rev. Nutr.* 29, 257–282.
- Yarasheski, K.E. (2003). Exercise, aging, and muscle protein metabolism. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 58, M918–922.
- Yehuda, S., Rabinovitz, S., Carasso, R.L., and Mostofsky, D.I. (2002). The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol. Aging* 23, 843–853.
- Yen, G.-C., Chen, H.-Y., and Peng, H.-H. (1997). Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Various Tea Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 45, 30–34.
- Yepuri, G., Marcelino, H., Shahkhalili, Y., Aprikian, O., Macé, K., Seydoux, J., L Miles, J., Montani, J.-P., and Dulloo, A.G. (2011). Dietary modulation of body composition and insulin sensitivity during catch-up growth in rats: effects of oils rich in n-6 or n-3 PUFA. *Br. J. Nutr.* 1–14.
- Yersin, A., Hirling, H., Kasas, S., Roduit, C., Kulangara, K., Dietler, G., Lafont, F., Catsicas, S., and Steiner, P. (2007). Elastic properties of the cell surface and trafficking of single AMPA receptors in living hippocampal neurons. *Biophys. J.* 92, 4482–4489.
- Ylikoski, R., Ylikoski, A., Keskiavaara, P., Tilvis, R., Sulkava, R., and Erkinjuntti, T. (1999). Heterogeneity of cognitive profiles in aging: successful aging, normal aging, and individuals at risk for cognitive decline. *Eur. J. Neurol.* 6, 645–652.
- Yoo, K.-Y., Choi, J.H., Hwang, I.K., Lee, C.H., Lee, S.O., Han, S.-M., Shin, H.-C., Kang, I.-J., and Won, M.-H. (2010). (-)-Epigallocatechin-3-gallate increases cell proliferation and neuroblasts in the subgranular zone of the dentate gyrus in adult mice. *Phytother Res* 24, 1065–1070.
- Yoo, D.Y., Kim, W., Yoo, K.-Y., Lee, C.H., Choi, J.H., Yoon, Y.S., Kim, D.-W., Won, M.-H., and Hwang, I.K. (2011). Grape seed extract enhances neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus in C57BL/6 mice. *Phytother Res* 25, 668–674.
- Young, C., Gean, P.W., Wu, S.P., Lin, C.H., and Shen, Y.Z. (1998). Cancellation of low-frequency stimulation-induced long-term depression by docosahexaenoic acid in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 247, 198–200.
- Young-Pearse, T.L., Chen, A.C., Chang, R., Marquez, C., and Selkoe, D.J. (2008). Secreted APP regulates the function of full-length APP in neurite outgrowth through interaction with integrin beta1. *Neural Dev* 3, 15.
- Youssef, I., Florent-Béchar, S., Malaplate-Armand, C., Koziel, V., Bihain, B., Olivier, J.-L., Leininger-Muller, B., Kriem, B., Oster, T., and Pillot, T. (2008). N-truncated amyloid-beta oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiol. Aging* 29, 1319–1333.
- Ypsilanti, A.R., Girão da Cruz, M.T., Burgess, A., and Aubert, I. (2008). The length of hippocampal cholinergic fibers is reduced in the aging brain. *Neurobiol. Aging* 29, 1666–1679.
- Yurko-Mauro, K.K. (2010). Cognitive and cardiovascular benefits of docosahexaenoic acid in aging and cognitive decline. 7, 190.
- Yurko-Mauro, K., McCarthy, D., Rom, D., Nelson, E.B., Ryan, A.S., Blackwell, A., Salem, N., and Stedman, M. (2010). Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline. *Alzheimer's & Dementia* 6, 456–464.
- Zandi, P.P., Sparks, D.L., Khachaturian, A.S., Tschanz, J., Norton, M., Steinberg, M., Welsh-Bohmer, K.A., and Breitner, J.C.S. (2005). Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cache County Study. *Arch. Gen. Psychiatry* 62, 217–224.
- Zarrouk, A., Vejux, A., Nury, T., El Hajj, H.I., Haddad, M., Cherkaoui-Malki, M., Riedinger, J.M., Hammami, M., and Lizard, G. (2012). Induction of mitochondrial changes associated with oxidative stress on very long chain fatty acids (C22:0, C24:0, or C26:0)-treated human neuronal cells (SK-NB-E). *Oxid Med Cell Longev.* 2012, 623257.
- Zelcer, N., and Tontonoz, P. (2006). Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J. Clin. Invest.* 116, 607–614.
- Zhao, W.Q., and Alkon, D.L. (2001). Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol. Cell. Endocrinol.* 177, 125–134.
- Zhao, Z., Xiang, Z., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Stetka, B., and Pasinetti, G.M. (2007). Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation of cases at high risk to develop Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 28, 824–830.
- Zhao, W.Q., Santini, F., Breese, R., Ross, D., Zhang, X.D., Stone, D.J., Ferrer, M., Townsend, M., Wolfe, A.L., Seager, M.A., et al. (2010). Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid beta oligomer-induced synaptic disruption. *J. Biol. Chem.* 285, 7619–7632.
- Zhao, Y., Calon, F., Julien, C., Winkler, J.W., Petasis, N.A., Lukiw, W.J., and Bazan, N.G. (2011). Docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 induces neuronal survival via secretase- and PPAR γ -mediated mechanisms in Alzheimer's disease models. *PLoS ONE* 6, e15816.
- Zhang, J., Wang, C., Li, L., Man, Q., Song, P., Meng, L., Du, Z.-Y., and Frøyland, L. (2010). Inclusion of Atlantic salmon in the Chinese diet reduces cardiovascular disease risk markers in dyslipidemic adult men. *Nutrition Research* 30, 447–454.
- Zhou, S., Fan, J., Lee, T.M.C., Wang, C., and Wang, K. (2011). Age-related differences in attentional networks of alerting and executive control in young, middle-aged, and older Chinese adults. *Brain Cogn* 75, 205–210.
- Zimmer, L., Delion-Vancassel, S., Durand, G., Guilloteau, D., Bodard, S., Besnard, J.C., and Chalon, S. (2000). Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.* 41, 32–40.
- Zou, K., Kim, D., Kakio, A., Byun, K., Gong, J.-S., Kim, J., Kim, M., Sawamura, N., Nishimoto, S., Matsuzaki, K., et al. (2003). Amyloid beta-protein (A β)₁₋₄₀ protects neurons from damage induced by A β ₁₋₄₂ in culture and in rat brain. *J. Neurochem.* 87, 609–619.
- Zuliani, G., Galvani, M., Leitersdorf, E., Volpato, S., Cavalieri, M., and Fellin, R. (2009). The Role of Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) in the Treatment of Dyslipidemias. *Current Pharmaceutical Design* 15, 4087–4093.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Liste des publications

1. THE ESSENTIAL ROLE OF LIPIDS IN ALZHEIMER'S DISEASE

Florent-Bécharde S, Desbène C, Garcia P, **Allouche A**, Youssef I, Escanyé MC, Koziel V, Hanse M, Malaplate-Armand C, Stenger C, Kriem B, Yen-Potin FT, Olivier JL, Pillot T, Oster T. *Biochimie*. (2009) 91, 804-9.

2. CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR CELL-BASED DELIVERY PREVENTS SYNAPTIC IMPAIRMENT AND IMPROVES MEMORY IN MOUSE MODELS OF ALZHEIMER'S DISEASE

Garcia P, Youssef I, Utvik JK, Florent-Bécharde S, Barthélémy V, Malaplate-Armand C, Kriem B, Stenger C, Koziel V, Olivier JL, Escanyé MC, Hanse M, **Allouche A**, Desbène C, Yen FT, Bjerkvig R, Oster T, Niclou SP, Pillot T. *J Neurosci*. (2010) 30, 7516-27.

Liste des communications affichées

- Congrès international de l'ICAD, **Vienne (Autriche)** (11-16 juillet 2011). 9^e Conférence internationale sur la maladie d'Alzheimer de l'Association Alzheimer

DIETARY DHA SUPPLEMENTATION LEADS TO SYNAPTIC PROTECTION AND COGNITIVE PRESERVATION IN ALZHEIMER'S DISEASE MOUSE MODEL

Sabrina Florent-Bécharde, **Ahmad Allouche**, Pierre Garcia, Ihsen Youssef, Baddredine Kriem, Catherine Malaplate-Armand, Christophe Stenger, Marine Hanse, Cédric Desbène, Violette Koziel, Marie-Christine Escanyé, Jean Luc Olivier, Frances T. Yen-Potin, Thierry Pillot & Thierry Oster

- Congrès international de l'ADPD, Barcelone (9-12 mars 2011). 10^e Conférence internationale sur les maladies d'Alzheimer et de Parkinson

CORRECTING DYSLIPIDEMIA MAY BE A VALUABLE APPROACH TO PREVENT COGNITIVE DECLINE AND ALZHEIMER'S DISEASE

Ahmad Allouche, Laurent Royer, Ihsen Youssef, Marie-Christine Escanyé, Violette Koziel, Catherine Malaplate-Armand, Jean Luc Olivier, Amélie Dhaussy, Sylvie Breton, Alain HUERTAS, Frances T. Yen-Potin, Thierry Pillot, Thierry Oster

- Congrès international de l'ICAD, Paris (16-21 juillet 2011). 11^e Conférence internationale sur la maladie d'Alzheimer de l'Association Alzheimer

DYSLIPIDEMIA IS A MODIFIABLE RISK FACTOR FOR CARDIOVASCULAR AND ALZHEIMER'S DISEASES

Ahmad Allouche, Laurent Royer, Ihsen Youssef, Marie-Christine Escanyé, Violette Koziel, Catherine Malaplate-Armand, Jean Luc Olivier, Amélie Dhaussy, Sylvie Breton, Alain HUERTAS, Frances T. Yen-Potin, Thierry Pillot, Thierry Oster

- Réunion Francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés, 11^{ème} réunion, Toulouse (22-24 Mai 2012)

LE TRAITEMENT DES DYSLIPIDÉMIES COMME APPROCHE D'INTÉRÊT POUR PRÉVENIR LE DÉCLIN COGNITIF ET LA MALADIE D'ALZHEIMER

Ahmad Allouche, Laurent Royer, Marie-Christine Escanyé, Catherine Malaplate-Armand, Jean Luc Olivier, Amélie Dhaussy, Sylvie Breton, Alain Huertas, Frances T. Yen, Thierry Pillot, Thierry Oster

- Congrès international du GERLI (Groupe d'étude et de recherche en lipidomique), 9^{ème} Congrès de lipidomique, Paris (17-19 Octobre 2012)

DYSLIPIDEMIA IS A MODIFIABLE RISK FACTOR FOR CARDIOVASCULAR AND ALZHEIMER'S DISEASES

Julie Colin, **Ahmad Allouche**, Laurent Royer, Marie-Christine Escanyé, Catherine Malaplate-Armand, Jean Luc Olivier, Frances Yen Potin, Amélie Dhaussy, Sylvie Breton, Alain Huertas, Thierry Pillot, Thierry Oster

RÉSUMÉ - ABSTRACT

La maladie d'Alzheimer est une démence sénile neurodégénérative liée au vieillissement et caractérisée par des pertes de la mémoire associées à d'autres troubles cognitifs et comportementaux. La toxicité des oligomères solubles du peptide β -amyloïde ($A\beta$) est centrale dans la perte synaptique et neuronale précoce de la maladie. L'absence de traitements curatifs, l'aspect chronique des mécanismes pathogéniques mis en jeu et le partage de facteurs de risque communs avec les pathologies cardiovasculaires, notamment les paramètres alimentaires et le métabolisme lipidique, doivent largement inciter à considérer l'intérêt de méthodes préventives permettant d'empêcher l'apparition de la maladie ou au moins de la retarder. Dès lors, l'approche nutritionnelle apparaît comme une stratégie capable de limiter la prévalence de la maladie.

À l'aide d'une souris modèle des stades précoces de la maladie d'Alzheimer conçu au laboratoire, nous avons cherché à évaluer le potentiel préventif d'une alimentation enrichie en acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6, *n*-3), l'acide gras polyinsaturé à longue chaîne (AGPI-lc) majoritaire dans le cerveau. Les résultats obtenus montrent qu'un apport alimentaire suffisant en DHA conduit à enrichir les membranes en cet acide gras dans les différentes structures cérébrales. En conséquence, les fonctions synaptiques dans l'hippocampe et le cortex sont préservées, même après exposition aiguë aux oligomères $A\beta$, ce qui maintient voire améliore les capacités cognitives des souris exposées. Ces améliorations sont corrélées positivement à l'enrichissement en DHA dans l'hippocampe et à la préservation de l'intégrité des synapses. Considérant que les perturbations de l'homéostasie lipidique sont corrélées à l'augmentation du risque de survenue des pathologies liées au vieillissement (métaboliques, cardiovasculaires et neurodégénératives), nous avons donc développé des stratégies nutritionnelles permettant d'évaluer les effets bénéfiques des AGPI-lc *n*-3 alimentaires contre la dyslipidémie induite par l'alimentation et les déficits cognitifs ou les processus neurodégénératifs associés au vieillissement normal et/ou au stress amyloïde caractéristique de la maladie d'Alzheimer. Les résultats obtenus à l'issue de notre étude révèlent qu'un apport alimentaire en AGPI-lc *n*-3 est capable de prévenir la dyslipidémie provoquée par un régime riche en lipides et de retarder le déclin cognitif lié au vieillissement cérébral normal ou pathologique.

Mots clés : acides gras polyinsaturés *n*-3, cognition, dyslipidémie, lipides, maladie d'Alzheimer, modèle souris, nutrition, oligomères $A\beta$ solubles, prévention, vieillissement

Alzheimer's disease is a neurodegenerative aging-related dementia that is characterized by loss of memory associated with other cognitive and behavioral disorders. Toxicity of soluble oligomers of β -amyloid peptide ($A\beta$) is a key element in synaptic and cellular loss in early stages of the disease. Absence of curative therapies, chronic aspects of the pathogenic mechanisms implicated and influence of common risk factors shared with the cardiovascular diseases, including dietary parameters and lipid metabolism, should widely encourage considering the interest of preventive interventions allowing slowing the progression and delaying the clinical onset of Alzheimer's-related troubles. Therefore, nutritional approaches could appear as a strategy able to reduce the prevalence of this disease.

Early Alzheimer's mouse model allowed us to assess the preventive potential of diets supplemented in docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 *n*-3), the most abundant long-chain polyunsaturated fatty acids (lc-PUFAs) in brain. Our results show that adequate dietary intake of DHA lead to increased levels in different structures of the central nervous system. Consequently, hippocampal and cortical synaptic functions were preserved, even upon acute exposure to $A\beta$ oligomers, maintaining or improving the cognitive capacities of $A\beta$ -exposed mice. These improvements were positively correlated with DHA-enrichment associated in hippocampus and with preserved synaptic integrity. Assuming that lipid homeostasis disorders are correlated with increased risk of developing aging-related (metabolic, cardiovascular and neurodegenerative) diseases, we designed nutritional strategies in order to evaluate the beneficial effects of *n*-3 lc-PUFAs on diet-induced dyslipidemia as well as on cognitive impairment and neurodegenerative processes associated with normal aging and/or with AD-representative amyloid stress. Our results show that dietary *n*-3 lc-PUFAs can prevent high-fat diet-induced dyslipidemia and delay cognitive decline related with normal or pathological aging.

Keywords: aging, Alzheimer's disease, cognition, dyslipidemia, lipids, mouse model, nutrition, *n*-3 polyunsaturated fatty acids, prevention, soluble $A\beta$ oligomers