



HAL
open science

Le vieillissement membranaire cérébral : conséquences fonctionnelles et protection par les acides gras polyinsaturés oméga-3 alimentaires

Julie Colin

► To cite this version:

Julie Colin. Le vieillissement membranaire cérébral : conséquences fonctionnelles et protection par les acides gras polyinsaturés oméga-3 alimentaires. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0078 . tel-01751720

HAL Id: tel-01751720

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751720v1>

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

École doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement

Équipe Biodisponibilité et Fonctionnalités des Lipides Alimentaires

Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Discipline « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »

par

Mme Julie COLIN

sur le sujet

Le vieillissement membranaire cérébral : conséquences fonctionnelles et protection par les acides gras polyinsaturés oméga-3 alimentaires

Soutenue publiquement le 19 juin 2015,

devant la commission d'examen composée de :

Rapporteurs :

Mme Véronique PALLET, Professeure, Université de Bordeaux 1&2

Mme Isabelle DENIS, Chargée de recherche, INRA, Jouy-en-Josas

Examineurs :

M. Athanase BENETOS, Professeur et praticien hospitalier, Université de Lorraine et CHU de Nancy

M. Michel LAGARDE, Professeur, Université de Lyon

M. Thierry OSTER, Professeur, Université de Lorraine - Directeur de thèse

Mme Catherine MALAPLATE-ARMAND, Maître de conférences et praticienne hospitalière, Université de Lorraine - Codirectrice de thèse

REMERCIEMENTS

À l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire, bien au contraire, elle se construit sur des rencontres et des échanges. Jamais je n'aurais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et la confiance m'ont permis de démarrer et de mener à bien ce travail.

En premier lieu, je remercie Véronique PALLET, Professeure à l'Université de Bordeaux 1 & 2 et Isabelle DENIS, Chargée de recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail. Je souhaite également remercier Athanase BENETOS, Professeur et praticien hospitalier à l'Université de Lorraine et au CHU de Nancy et Michel LAGARDE, Professeur à l'Université de Lyon pour avoir accepté de participer à ce jury et pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à l'égard de ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes encadrants, le Dr Catherine MALAPLATE-ARMAND et le Pr. Thierry OSTER, sans qui cette thèse n'aurait pas été possible. Je les remercie pour leur confiance, leurs qualités pédagogiques et scientifiques, leurs conseils avisés, le temps qu'ils ont consacré à l'élaboration de ce travail. J'ai également été sensible à leurs qualités humaines de compréhension et leur sympathie tout au long de cette thèse. J'ai beaucoup appris à leurs côtés et leur adresse pour tout cela ma profonde gratitude.

Mes remerciements s'adressent également au Dr Frances YEN-POTIN, directrice du laboratoire LIPIDOMIX à mon arrivée, puis animatrice de l'équipe BFLA, qui m'a accueillie au sein du laboratoire et m'a accordé sa confiance pour ces travaux. Je remercie par la même occasion le Pr Guido RYCHEN, directeur de l'URAFPA, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de son laboratoire.

Je souhaite souligner l'importance dans la réalisation de cette thèse de la Région Lorraine et de la Société Française de Nutrition pour leur soutien financier.

J'adresse mes vifs remerciements à l'ensemble des membres statutaires, anciens ou actuels, de l'équipe BFLA que j'ai eu l'honneur de rencontrer au cours de ces années, les Dr Lynn GREGORY-PAURON, Marie-Claire LANHERS et Thierry PILLOT, les Pr. Thomas CLAUDEPIERRE et Jean-Luc OLIVIER ainsi que Marie-Antoinette DZIURLA et Violette KOZIEL pour leurs conseils et leurs encouragements. Je remercie tout particulièrement le Pr. Catherine CORBIER pour l'opportunité et la confiance qu'elle m'a accordées concernant les enseignements que j'ai réalisés lors de mon ATER.

Il me tient sincèrement à cœur de remercier tous les membres du laboratoire, anciens et nouveaux collègues qui pour la plupart sont devenus des amis Ahmad, Annabelle, Anthony, Dorine, Hamed, Laurent, Lise, Marion, Martial, Mélanie, Mylène, Nicolas, Samina et Sandra. Une pensée toute particulière à Mélanie, avec qui j'ai fini ces derniers mois de thèse, un grand merci pour ta sympathie, ton écoute, ta gentillesse, ta franchise, à toutes nos longues conversations sur l'avenir et en souvenir de tes maladresses qui nous ont fait tant rire. Courage pour la suite, c'est presque fini. Un merci particulier à Ahmad pour ta patience et ta contribution lors de ma première année de thèse. De grands mercis à Dorine pour ta gentillesse, ton écoute et ton franc-parler, à

Laurent pour ton imagination débordante et tes jeux de mots dévastateurs, à Mylène pour ta bonne humeur. Merci également à Anthony. Nous avons débuté notre thèse ensemble et pendant trois ans, nous avons partagé les mêmes moments de doutes, de stress mais aussi et surtout des fous rires inoubliables. Un merci spécial à Annabelle pour ton aide technique, ta contribution à ce travail et pour avoir consacré du temps à ma formation *in vivo*, en souvenir des longues journées de stéréotaxie passées sans voir la lumière du jour, à ta bonne humeur et à tes « annabelles » qui te caractérisent si bien. Un autre merci spécial à Marion pour ton aide technique et ta contribution aux dosages, pour ton enthousiasme, ton rire communicatif, sans oublier tes « talents organisationnels » qui nous ont fait vivre de grands moments dont certains ont marqué notre esprit à tous ! Enfin, merci à Sandra, pour ta joie de vivre et tes anecdotes insolites et à Martial, élu meilleur stagiaire de tous les temps. Un grand merci à tous pour votre amitié, votre soutien, pour tous ces merveilleux moments passés ensemble et pour les souvenirs qu'ils laissent. Vous avez su créer une formidable ambiance de travail et sans vous, cette thèse n'aurait pas été si agréable.

Je termine ces remerciements par le plus important pour moi, mes proches, famille et amis de longue date.

Mes plus profonds remerciements vont à mes parents, grâce à qui j'ai pu en arriver là. Pour votre amour et votre soutien inconditionnels. Tout au long de mon cursus, vous avez toujours su croire en moi et m'avez apporté vos encouragements et toute votre aide quand j'en ai eu besoin. Vous avez su me donner toutes les chances pour réussir. Trouvez, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de vos efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude. Je tiens également à remercier mes grands-parents pour leur amour, leur soutien et leur bienveillance. Je remercie aussi toute ma famille qui a contribué de près ou de loin à ce que je suis devenue.

Mes remerciements les plus affectueux vont à Cédric. Merci pour ton soutien et ton amour sans lesquels je n'aurais pu m'accomplir. Merci d'avoir cru en moi, malgré les moments de doute et de fatigue, d'avoir été présent pour m'écouter, m'encourager et me reconforter dans les périodes difficiles. Merci d'être là chaque jour à mes côtés.

Je remercie également tous mes plus proches amis avec qui j'ai partagé des moments inoubliables durant ces années. Merci à Julie, la meilleure de toutes les amies, pour être là depuis plus de 13 ans quoi qu'il arrive, pour m'écouter et me soutenir (même quand j'ai tort). Merci à Caro, la deuxième meilleure de toutes les amies, pour tous ces moments passés ensemble à parler, à rire et à vivre. Merci également à Clément, Jessica, Valentin, Aurélie & Romain, pour votre gentillesse, votre bonne humeur, pour toutes ces soirées de détente, ces week-end de folie, ces tranches de rire qui rendent la vie plus agréable et qui permettent d'évacuer les tensions. J'envoie aussi un merci outre-Atlantique à Michael et Devon pour vos encouragements et pour nous avoir donné l'opportunité de vivre le plus incroyable des voyages. Merci à tous pour votre merveilleuse amitié !

Enfin, merci à tous ceux que je n'ai pas cités mais qui devraient l'être aussi.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIÈRES	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	9
ABRÉVIATIONS.....	12
AVANT-PROPOS.....	17
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	21
I. Du vieillissement biologique au vieillissement pathologique	21
A. Le vieillissement de la population en quelques chiffres.....	22
B. Comment caractériser le vieillissement ?.....	24
1. Le concept de « vieillissement réussi »	25
2. Le vieillissement normal : état de résilience ou syndrome de fragilité.....	26
3. Le vieillissement pathologique.....	27
C. Comment expliquer le phénomène de vieillissement biologique ?	27
1. Les théories génétiques programmées	27
a. Le vieillissement programmé	28
b. L'horloge biologique : le raccourcissement des télomères.....	28
2. Les théories aléatoires	29
a. La théorie de l'erreur catastrophique	29
b. La théorie de la glycation non enzymatique des protéines	30
c. La théorie des radicaux libres.....	32
D. Les mécanismes biologiques du vieillissement cérébral	36
1. Modifications neurobiologiques du cerveau vieillissant	36
2. Profil des gènes de la fonction neuronale.....	38
3. Accumulation protéique toxique pour le cerveau	40
4. Stress oxydant cérébral	41
5. Atteinte de la signalisation insulinique	42
E. La maladie d'Alzheimer : une maladie neurodégénérative	44
1. Mild Cognitive Impairment	44
2. Le cas de la maladie d'Alzheimer	44
F. Vieillissement et maladies métaboliques	47
1. Effets du vieillissement sur la composition corporelle.....	47
2. Le métabolisme glucidique et le diabète de type 2	48
3. Le métabolisme lipidique, l'obésité et les dyslipidémies	50
II. La nutrition, une approche préventive du vieillissement cérébral.....	57
A. La nutrition et le vieillissement cérébral	57
1. Les apports nutritionnels conseillés	57
2. Les régimes riches en graisses saturées, en sucres et en cholestérol.....	59
3. Les acides gras trans.....	60
4. La restriction calorique.....	61
5. Les vitamines, antioxydants et polyphénols	65
6. Les acides gras polyinsaturés	67
7. Le régime méditerranéen.....	69

8. L'attrait des industriels agro-alimentaires	69
B. Les AGPI, des acides gras particuliers	70
1. Nomenclature.....	71
2. Essentialité, précurseurs et conversion des acides gras	72
3. Absorption, transport et distribution au cerveau	74
4. La biodisponibilité des acides gras	76
C. Effets cérébraux des AGPI.....	78
1. Rôle dans la composition des membranes cérébrales.....	78
2. Rôle dans la neurotransmission	80
3. Rôle de messenger	82
4. Rôles dans le cerveau vieillissant	84
III. Les membranes, un compartiment actif à part entière	86
A. Les domaines rafts dans les membranes	86
1. Composition	87
2. Extraction et isolement	87
3. Localisation.....	88
4. Protéines spécifiques et fonctions cérébrales associées	89
a. La cavéoline, les cavéoles et l'endocytose	89
b. La flotilline, les rafts, l'endocytose et la signalisation	90
c. Rôle des rafts dans les neurones.....	93
B. Les domaines non-rafts dans les membranes	94
1. Composition et propriétés	95
2. Fonctions cérébrales associées aux zones fluides.....	96
C. Effets du vieillissement sur les membranes neuronales.....	97
1. Effet global sur les teneurs en lipides membranaires	97
2. Conséquences sur les propriétés des membranes neuronales.....	99
3. Anomalies des rafts et vieillissement cérébral pathologique	101
 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL	 105
 MATÉRIELS ET MÉTHODES	 107
I. Études animales.....	107
A. Animaux et conditions d'hébergement	107
B. Traitements.....	107
1. Régimes alimentaires	107
2. Prélèvements sanguins.....	108
3. Mesures de la masse corporelle et de l'apport alimentaire	109
4. Chirurgie stéréotaxique.....	109
a. Préparation des solutions injectables	109
b. Anesthésie.....	109
c. Injection intracérébrale.....	109
C. Analyses comportementales.....	111
1. Système de capture vidéo.....	111
2. Procédure standard d'évaluation des mémoires à court et à long terme	111
a. Étude de la mémoire à court terme	111
b. Étude de la mémoire à long terme.....	112
II. Échantillonnage	113

A. Dissection et prélèvements tissulaires	113
1. Prélèvements des structures cérébrales pour les analyses biochimiques	113
2. Prélèvements de cerveaux entiers pour les études immunohistologiques	114
B. Préparation de fractions riches en neurosynaptosomes	114
C. Préparation des homogénats.....	115
D. Extraction et purification des microdomaines membranaires	115
1. Séparation des fractions membranaires	115
2. Analyse de la composition des fractions obtenues	117
a. Dosage du cholestérol.....	117
b. Immunodétection des marqueurs spécifiques.....	117
III. Analyses biochimiques	117
A. Dosage du glucose plasmatique	117
B. Dosage de l'insuline plasmatique	117
C. Dosage de la leptine plasmatique.....	118
D. Dosages lipidiques	118
E. Extraction des lipides cérébraux.....	119
F. Dosage des acides gras	119
G. Dosage des protéines.....	120
H. Analyses par immunoblot	120
1. Électrophorèse	120
2. Électrotransfert	121
3. Immunorévélation des protéines	121
IV. Analyses par microscopie confocale.....	122
A. Principe de la microscopie confocale	122
B. Marquage par immunofluorescence : DuoLink® <i>in situ</i>	123
V. Analyses statistiques	123
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	125
I. Le vieillissement altère la capacité de réponse cérébrale d'une cible thérapeutique potentielle pour la MA.....	125
A. Étude préliminaire : choix d'un modèle de vieillissement biologique.....	125
1. Démarche expérimentale.....	125
2. Analyses des paramètres métaboliques.....	126
3. Analyses des capacités mnésiques.....	129
4. Modèle de vieillissement biologique	131
B. Choix d'un modèle de voie thérapeutique potentielle contre la MA.....	133
C. Effets du vieillissement biologique sur la réponse cérébrale au CNTF	136
1. Démarche expérimentale.....	136
2. Impact de l'âge sur la cinétique de réponse au CNTF	136
D. Effets du vieillissement biologique sur la localisation membranaire cérébrale du CNTF-R	142
1. Démarche expérimentale.....	142
2. Impact de l'âge sur la composition et la structure des microdomaines membranaires.....	142
3. Impact du remodelage membranaire lié à l'âge sur le complexe CNTF-R	146
E. Le régime hyperlipidique, un facteur de risque du vieillissement.....	152
1. Démarche expérimentale.....	152
2. Analyses des paramètres métaboliques.....	153
3. Impact du régime hyperlipidique sur la structure des microdomaines membranaires.....	156

4. Impact du remodelage membranaire lié au régime hyperlipidique sur le complexe récepteur CNTF-R et son activité	157
F. Conclusions	162
II. Le DHA, facteur anti-vieillessement, prévient des dyslipidémies, restaure les capacités de réponse cérébrale au CNTF et protège du déclin cognitif	163
A. Le DHA, un facteur de protection contre la dyslipidémie et le vieillissement biologique	163
1. Démarche expérimentale	163
2. Analyses des paramètres métaboliques	164
3. Impact du régime enrichi en DHA sur la composition et la structure des microdomaines membranaires	168
4. Impact du remodelage membranaire lié au régime enrichi en DHA sur le complexe récepteur CNTF-R et son activité	170
5. Impact du remodelage membranaire induit par le DHA sur la fonctionnalité cérébrale	175
B. Le DHA, un facteur de protection contre le stress amyloïde et le déclin cognitif, capable de potentialiser la réponse au CNTF	178
1. Démarche expérimentale	178
2. Effets du DHA et du CNTF sur les capacités mnésiques et cognitives des souris modèles de la MA	179
a. Évaluation de la mémoire à court terme	179
b. Analyse des capacités d'apprentissage	181
c. Analyses de la mémoire à long-terme	185
C. Conclusions	188
CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES	191
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	197
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	219
RÉSUMÉ – ABSTRACT	221

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures :

Figure 1 : Population des plus de 60 ans dans le monde depuis 1950.....	23
Figure 2 : Proportion des plus de 65 ans en 2008 et prévisions pour 2040 dans 29 pays européens	24
Figure 3 : Trois types de vieillissement fonctionnel	25
Figure 4 : Action schématique de la télomérase humaine.....	29
Figure 5 : Exemple schématique de glycation non enzymatique des protéines	30
Figure 6 : Phénotype lié au vieillissement chez la souris mutante pour la protéine PolgA	33
Figure 7 : Rôle de la mitochondrie dans la production d'espèces radicalaires oxygénées	34
Figure 8 : Modulation de l'expression de gènes par le vieillissement dans le cerveau humain	38
Figure 9 : Anomalie comportementale et dégénérescence neuronale des souris dépourvues de la protéine Atg5 dans le SNC.....	41
Figure 10 : Récapitulatif des voies de signalisation affectées par l'insuline dans le SNC.....	43
Figure 11 : Lésions histopathologiques cérébrales (cortex) caractéristiques de la MA.....	45
Figure 12 : Glycémie et insulinémie au cours du vieillissement chez l'homme	48
Figure 13 : Adultes souffrant de diabète en 2010 et estimation pour 2030 en fonction de l'âge.....	49
Figure 14 : Concentrations plasmatiques en triglycérides et en acides gras au cours du vieillissement chez le rat.....	52
Figure 15 : Évolution de la prévalence de l'obésité en France entre 1997 et 2012	53
Figure 16 : Configuration cis et trans des acides gras	60
Figure 17: Modélisation géométrique de l'influence de l'alimentation sur la longévité d'insectes	62
Figure 18 : Survie de souris Ames et sauvages sous restriction calorique ou sous régime ad libitum	63
Figure 19: Évolution des performances mnésiques de personnes âgées sous restriction calorique.....	64
Figure 20: Teneur en AGPI n-6 et n-3 d'huiles végétales	72
Figure 21: Conversion des précurseurs d'AGPI n-6 et n-3	73
Figure 22 : Représentation schématique de la structure de la barrière hémato-encéphalique.....	75
Figure 23 : Représentation schématique du transport des acides gras au travers de la BHE.....	76
Figure 24: Voie des médiateurs lipidiques	83
Figure 25 : Composition d'un raft	87
Figure 26 : Observation de cavéoles au microscope électronique	89
Figure 27 : Modèles illustrant le rôle des rafts sur l'activation de voies de signalisation	93
Figure 28 : Conformations du DHA dans l'espace selon une simulation de dynamique moléculaire.....	95
Figure 29 : Ingrédients composant le régime hyperlipidique	108
Figure 30 : Repères anatomiques de référence Bregma et Lambda sur le crâne de souris.....	110
Figure 31 : Test du labyrinthe en Y pour l'évaluation de la mémoire à court terme	111
Figure 32: Test de la piscine de Morris pour l'évaluation de la mémoire à long terme	112
Figure 33 : Protocole d'extraction et de purification des microdomaines membranaires	116
Figure 34 : Effets de l'âge sur la masse corporelle et l'apport énergétique des souris	126
Figure 35 : Effets de l'âge sur le bilan plasmatique à jeun des souris.....	127
Figure 36 : Effets de l'âge sur les ratios en AGPI n-6/n-3, ARA/DHA et la teneur en AGS dans les cellules sanguines et le cortex cérébral des souris.....	128
Figure 37 : Effets de l'âge sur la mémoire à court terme et la capacité exploratoire des souris.....	129
Figure 38 : Effets de l'âge sur les niveaux de protéines synaptiques dans le cortex et l'hippocampe des souris.....	130

Figure 39 : Activation et signalisation du complexe CNTF-R après fixation de son ligand.....	135
Figure 40 : Effets de l'âge sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans l'hippocampe des souris	137
Figure 41 : Effets de l'âge sur la cinétique d'activation par le CNTF de la voie de transduction de STAT ₃ dans l'hippocampe des souris.....	138
Figure 42 : Effets de l'âge sur la cinétique d'activation par le CNTF de la voie de transduction d'ERK _{1/2} dans l'hippocampe des souris	139
Figure 43 : Effets de l'âge sur la teneur en cholestérol des membranes corticales des souris.....	143
Figure 44 : Effets de l'âge sur la répartition des microdomaines membranaires de cortex des souris	144
Figure 45 : Effets de l'âge sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans les membranes corticales des souris	146
Figure 46 : Effets de l'âge sur la colocalisation des sous-unités du CNTF-R dans le cortex cérébral des souris	147
Figure 47: Effets de l'âge sur la colocalisation des sous-unités du CNTF-R dans les rafts corticaux des souris	149
Figure 48: Effets de l'âge sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans les rafts corticaux des souris	150
Figure 49: Effets du régime hyperlipidique sur l'apport alimentaire et énergétique des souris de 6 mois	153
Figure 50 : Effets du régime hyperlipidique sur l'évolution de la masse corporelle des souris de 6 mois .	154
Figure 51 : Effets du régime hyperlipidique sur l'évolution de la cholestérolémie et de la triglycéridémie des souris de 6 mois	155
Figure 52: Effets du régime hyperlipidique sur l'évolution des AG érythrocytaires des souris de 6 mois..	155
Figure 53: Effets du régime hyperlipidique sur la répartition des microdomaines membranaires de cortex des souris de 6 mois	156
Figure 54 : Effets du régime hyperlipidique sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans les rafts corticaux des souris de 6 mois	158
Figure 55 : Effets du régime hyperlipidique sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans les homogénats totaux d'hippocampe des souris de 6 mois.....	159
Figure 56 : Effets du régime hyperlipidique sur l'activation par le CNTF des voies de transduction de STAT ₃ et ERK _{1/2} dans l'hippocampe des souris de 6 mois	160
Figure 57 : Effets du régime supplémenté en DHA sur l'apport alimentaire des souris de 18 mois	164
Figure 58 : Effets du régime supplémenté en DHA sur l'évolution de la masse corporelle des souris de 18 mois	165
Figure 59 : Effets du régime supplémenté en DHA sur les lipides plasmatiques des souris de 18 mois ...	166
Figure 60 : Effets des différents régimes testés sur les lipides plasmatiques des souris de 6 ou 18 mois .	167
Figure 61 : Effets du régime supplémenté en DHA sur la teneur en cholestérol des membranes corticales des souris de 18 mois	169
Figure 62 : Effets du régime supplémenté en DHA sur la répartition des microdomaines membranaires de cortex des souris de 18 mois	169
Figure 63 : Effets du régime supplémenté en DHA sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans les rafts corticaux des souris de 18 mois.....	171
Figure 64 : Effets des différents régimes testés sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans les rafts corticaux des souris de 6 ou 18 mois.....	171
Figure 65 : Effets du régime supplémenté en DHA sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans les homogénats totaux d'hippocampe des souris de 18 mois.....	172
Figure 66 : Effets du régime supplémenté en DHA sur l'activation par le CNTF des voies de transduction de STAT ₃ et ERK _{1/2} dans l'hippocampe des souris de 18 mois.....	173

Figure 67 : Effets des différents régimes testés sur l'activation par le CNTF des voies de transduction de STAT ₃ et ERK _{1/2} dans l'hippocampe des souris de 6 ou 18 mois.....	174
Figure 68 : Effets du régime supplémenté en DHA sur les niveaux de protéines synaptiques dans la fraction brute de synaptosomes d'hippocampe des souris de 18 mois	176
Figure 69 : Caractérisation des sous-groupes et scénario d'évaluation des performances mnésiques des souris.....	179
Figure 70 : Effets du régime supplémenté en DHA et du CNTF sur la mémoire à court terme des souris de 18 mois	179
Figure 71 : Effets du régime supplémenté en DHA sur les capacités d'apprentissage des souris de 18 mois	181
Figure 72 : Effets du régime supplémenté en DHA sur l'impact des oligomères Aβs sur les capacités d'apprentissage des souris de 18 mois	182
Figure 73 : Effets du régime supplémenté en DHA et du CNTF sur les capacités d'apprentissage des souris de 18 mois	183
Figure 74 : Effets des régimes et du CNTF sur la susceptibilité au stress amyloïde lors de la phase d'apprentissage des souris de 18 mois exposées aux oligomères Aβs	184
Figure 75 : Effets des régimes sur l'activité du CNTF et la susceptibilité au stress amyloïde lors de la phase d'apprentissage des souris de 18 mois exposées aux oligomères Aβs	184
Figure 76 : Effets du régime supplémenté en DHA et du CNTF sur la mémoire à long terme des souris âgées de 18 mois	185

Liste des tableaux :

Tableau I : Évolution de l'espérance de vie à la naissance en France depuis 1789	22
Tableau II : Évolution de l'espérance de vie à 60, 75 et 85 ans en France depuis 1950	22
Tableau III : Masse corporelle et sa composition au cours du vieillissement chez l'homme.....	47
Tableau IV : Suivi des recommandations alimentaires de la population suisse en 2009.....	58
Tableau V : Risques pour le SNC associés à un déficit en minéraux et vitamines chez les personnes âgées.....	58
Tableau VI : Nomenclature des principaux acides gras.....	71
Tableau VII : Composition des glycérophospholipides et des sphingophospholipides.....	79
Tableau VIII: Composition des régimes alimentaires.....	108
Tableau IX : Anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages fluorescents	114
Tableau X: Anticorps secondaires utilisés pour les immunomarquages fluorescents	114
Tableau XI : Identification des acides gras par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse	120
Tableau XII : Anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages	122
Tableau XIII : Anticorps secondaires utilisés pour les immunomarquages	122

ABRÉVIATIONS

A

Aβ / Aβs	Peptide amyloïde β / Peptide amyloïde β soluble
ACh	Acétylcholine
ADPD	<i>Alzheimer's disease and Parkinson's disease</i>
AG	Acide gras
AGE	<i>Advanced glycation end products</i>
AGI	Acide gras insaturé
AGMI	Acide gras monoinsaturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AGPI-EE/PL/TG	Acide gras polyinsaturé lié à l'ester éthylique / aux phospholipides / aux triglycérides
AGPI-LC	Acide gras polyinsaturé à longue chaîne
AGS	Acide gras saturé
AGT	Acide gras <i>trans</i>
AJR	Apports journaliers recommandés
AKT/PKB	Protéine kinase B
ALA	Acide α-linolénique
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
APH1	<i>Anterior pharynx-defective 1</i>
ApoE	Apolipoprotéine E
APP	Protéine précurseur du peptide amyloïde β
A/R	Aspiration/refoulement
ARA	Acide arachidonique
Arc	<i>Activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i>
Atg	<i>Autophagy-related protein</i>

B

BACE1	β-sécrétase 1
Bad	<i>The Bcl-2-associated death promoter</i>
Bax	<i>The Bcl-2 associated X protein</i>
BCA	Acide bicinchoninique
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BECN	Bécline
BFLA	Biodisponibilité et Fonctionnalités des Lipides Alimentaires
BHE	Barrière hémato-encéphalique

C

CaMK	Protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante
CDK	<i>Cyclin-dependant kinase</i>
CELMEA	Comité d'Éthique Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale
CNEG	Collège National des Enseignants de Gériatrie
CNTF	Facteur neurotrophique ciliaire
CNTF-R	Récepteur du CNTF
COX	Cyclooxygénase

CPG	Chromatographie en phase gazeuse
cPLA	Phospholipase A cytosolique dépendante du calcium
CPSF	<i>Cleavage and polyadenylation specific factor</i>
CREB	<i>C-AMP response element-binding protein</i>
Cyp46	Cholestérol 24S-hydroxylase

D

DASH	<i>Dietary approaches to stop hypertension</i>
DHA	Acide docosahexaénoïque
DHA+	Régime standard enrichi en DHA
DHA-EE	DHA sous forme d'ester éthylique
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DNF	Dégénérescences neurofibrillaires
DPA	Acide docosapentaénoïque
DTT	Dithiothréitol

E / F

EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EE	Ester éthylique
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPA	Acide eicosapentaénoïque
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ERO	Espèces radicalaires oxygénées
FABPpm	<i>Fatty acid binding protein plasma membrane</i>
FAT/CD36	<i>Fatty acid translocase/CD36</i>
FATP	<i>Fatty acid transport protein</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>

G

Gab	<i>Grb associated binder</i>
GABA	Acide γ -aminobutyrique
Gap	<i>Growth-associated protein</i>
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GluR1/2	Sous-unités du récepteur du glutamate
GM1	Ganglioside M1
Gp130	Glycoprotéine 130
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPL	Glycérophospholipide
GSK3/FOXO	<i>Glycogen stynthase kinase-3/O subfamily of forkhead/winged helix transcription factors</i>

H

5-HT	Récepteur 5-HT de la sérotonine
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HL	Hyperlipidique
HNF	Facteur nucléaire hépatique
HRP	Peroxydase de raifort

I

Icv	Intracérébroventriculaire
IDE	Enzyme de dégradation de l'insuline
IFN	Interféron
IGF	<i>Insulin(-like) growth factor</i>
IgG	Immunoglobuline G
I-κB	Protéine inhibitrice de NF-κB
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
INED	Institut National d'Études Démographiques
INSEE	Institut National de la Statistique et des Études Économiques
iPLA	Phospholipase A indépendante du calcium
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IRS	Récepteur de l'insuline
IUP	Protéine ubiquitinylée insoluble

J / K / L

JAK	Janus kinase
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>
LA	Acide linoléique
I _d	Phase liquide désordonnée
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LIF	<i>Leukemia inhibitor factor</i>
LIFRβ	Récepteur du LIF
I _o	Phase liquide ordonnée
LOX	Lipoxygénase
LPC	Lysophospholipide
LSR	<i>Lipolysis stimulated lipoprotein receptor</i>
LT	Leucotriène

M

MA	Maladie d'Alzheimer
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MβCD	Méthyl-β-cyclodextrine
MCI	<i>Mild cognitive impairment</i>
MES	<i>2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid sodium salt</i>
MIDAS	<i>Memory improvement with DHA study</i>
MMP	Métalloprotéase matricielle
MnSOD	Superoxyde dismutase à manganèse
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
m/v	Masse/volume

N / O

Na ₃ VO ₄	Orthovanadate de sodium
Narp	<i>Nitrate/nitrite response regulator protein</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor of κ B</i>
NF-κBIA	<i>Nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in β-cells Inhibitor α</i>

NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NK1R	Récepteur de la neurokinine 1
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
NO ₃ ⁻	Peroxinitrite
NPD	Neuroprotectine D
NR2A/B	Sous-unités du récepteur NMDA
NT	Neurotrophines
¹ O ₂	Oxygène singulet
³ O ₂	Oxygène triplet
O ₂ ^{•-}	Radical superoxyde
OH [•]	Radical hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONU	Organisation des Nations Unies

P

PBS	Tampon phosphate salin
PC	Phosphatidylcholine
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEN-2	<i>Presenilin enhancer-2</i>
P-ERK	Phospho-ERK
PG	Prostaglandine
PGC	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator</i>
PHB	<i>Prohibit in homology</i>
PHF	Paire de filaments hélicoïdaux
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PL	Phospholipide
PLA	Phospholipase A
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
Polga	Sous-unité catalytique de l'ADN polymérase Polg mitochondriale
PPAR _γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
Proph	<i>Prophet of pituitary factor</i>
PS	Phosphatidylsérine
PSD-95	<i>Postsynaptic density protein 95</i>
PSEN	Préséniline
P-STAT	Phospho-STAT
PVDF	Difluorure de polyvinylidène

Q / R

QC	Contrôle qualité
RAGE	Récepteur des AGE
RAR/RXR	Récepteur des rétinoïdes
RC	Restriction calorique
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G

RE	Réticulum endoplasmique
RIPA	<i>Radio immunoprecipitation assay buffer</i>
rTF	Récepteur de la transferrine
rTG	TG réestérifiés
RTK	Récepteur à activité tyrosine-kinase

S

S100A1	<i>S100 calcium binding protein A1</i>
SDA	Acide stéaridonique
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium
SEM	Erreur standard de la moyenne
SERT	Sérotonine
SHP2	<i>Protein-tyrosine phosphatase 2</i>
SM	Sphingomyéline
SNAP-25	<i>Synaptosomal-associated protein 25</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor</i>
SNC	Système nerveux central
SPFH	<i>Stomatin prohibit in flotillin homology</i>
SPL	Sphingophospholipides
sPLA	Phospholipase A secrétée
SREBP	<i>Sterol regulatory element binding protein</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
Std	Standard

T

TG	Triglycérides
THX	Thromboxane
Timp	<i>Tissue metalloproteinase inhibitor</i>
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TOR	<i>Target of rapamycin</i>
Trk	Tyrosine kinase
TSH	<i>Thyroid stimulating hormone</i>
Txnip	<i>Thioredoxin interacting protein</i>

U / V / W / X / Y / Z

UR AFPA	Unité de recherche animal et fonctionnalités des produits animaux
VAMP2	<i>Vesicle associated membrane protein</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
v/v	Volume/volume

AVANT-PROPOS

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'études réalisées au sein de l'équipe Biodisponibilité et Fonctionnalités des Lipides Alimentaires (BFLA) rattachée à l'Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (UR AFPA, EA 3998, USC INRA 0340). Le travail réalisé visait à établir des liens entre les facteurs de vieillissement et la détérioration de la fonctionnalité cérébrale. Il avait aussi pour but de faire la preuve du concept selon lequel des stratégies préventives alimentaires peuvent être primordiales pour prévenir le vieillissement cérébral.

Les travaux de cette thèse s'intègrent dans les réflexions actuelles sur le vieillissement de la population qui est devenu une problématique majeure de santé publique. En effet, entre 2005 et 2010, l'espérance de vie à 65 ans s'est allongée de 1 an et 4 mois dans l'Union européenne. En 2010, il restait ainsi en moyenne près de 19,5 ans de vie à un Européen âgé de 65 ans et cette progression s'est poursuivie en 2012 (Eurostat, 2013). Mais pour l'instant, vivre plus longtemps ne signifie pas nécessairement vivre des années de plus en bonne santé, puisque l'espérance de vie sans incapacité a plutôt tendance à stagner ces dernières années, voire à reculer en France comme le confirme l'étude de 2015 menée par l'Institut national de la statistique et des études économiques. L'impact des maladies liées au vieillissement sur la qualité de vie des seniors semble donc évident.

Une telle situation engendre de nombreux problèmes, tant sur les plans médical et sanitaire que social, démographique et économique. « Vieillir, mais à quel prix ? ». L'interrogation revient souvent dans les rapports d'études sur le sujet, la question du prix pouvant s'entendre de deux façons. Dans une dimension économique, en termes de coût pour la société, de financement par les organismes de sécurité sociale, de dépendance et d'institutionnalisation, et dans un contexte psychologique ou philosophique : « Au prix de quoi vieillissons-nous ? », ce qui revient alors à se demander : « Comment pouvons-nous bien vieillir ? ». Vieillir sans être vieux, un enjeu de ce début de troisième millénaire dans les pays développés. En effet, dans notre société moderne, le mot « vieux » est un terme péjoratif, synonyme de déclin et de déficit, dont personne ne veut se qualifier. S'il est vrai que le vieillissement suggère l'idée de perte progressive des capacités physiques et intellectuelles, il est difficile d'accepter de vieillir et de se voir vieux. D'ailleurs, de nouveaux termes moins dépréciatifs sont employés, comme senior et retraité actif. Lors du festival XYZ du mot nouveau en 2013, le « Senior » est même devenu le « Plénior », jugé plus positif pour évoquer le senior dynamique, en activité ou non, qui croque la vie à pleine dents.

« Vieillir, c'est vieillir, rien de plus », constatait Simone de Beauvoir. Une expérience naturelle, inéluctable et partagée par toute l'humanité. Caractériser le vieillissement n'est cependant pas aussi simple. En effet, il n'existe pas de réelle définition universelle du vieillissement, car il peut être envisagé

sous différents angles. Le vieillissement peut être appréhendé au regard de l'état civil, et dans ce cas il est uniquement évalué sur le versant temporel. Quant au vieillissement démographique de la population, il impose une vision plus globale dans un ensemble donné, schématisé par l'extrémité droite de la gaussienne représentant l'ensemble de la répartition de la population en fonction de l'âge. Il existe le vieillissement pour les sociologues, les psychologues et les gérontologues, celui aussi qui est subjectif, lié au regard de la société ou de l'individu lui-même. Socialement, il existe le vieillissement associé à un âge qui est, lui aussi, un indice subjectif. D'après des psychiatres et gériatres, l'âge chronologique calculé se distingue de l'âge physique, lié au mode de vie et de l'âge social, qui est l'âge du cerveau, du moral, de l'image des autres. Enfin, pour le biologiste, le vieillissement est le résultat de processus cellulaires et moléculaires complexes cumulatifs se traduisant par un déclin des fonctions physiologiques. Il s'agit dans ce cas d'une succession d'événements dans le temps suivant une cinétique plus ou moins rapide dépendant de l'influence de paramètres environnementaux capables d'accélérer ou de ralentir ces processus. Ces notions d'âge et de vieillissement sont toutes très floues, ce qui rend délicate la tâche de définir clairement le vieillissement.

Avec l'allongement de la vie, la prévalence de nombreuses maladies liées au vieillissement, parmi lesquelles les pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (MA), ne cesse d'augmenter. Les mécanismes qui favorisent cette maladie restent encore aujourd'hui assez mal connus. Il est admis que l'âge est un élément crucial, puisque la prévalence de la maladie double tous les 5 ans après 65 ans (Bishop *et al.*, 2010), ce qui suggère le caractère évolutif des troubles associés autant que la chronicité de l'exposition aux facteurs de risque. En effet, le développement de la MA et des autres pathologies liées au vieillissement est sous l'influence conjointe de facteurs génétiques, mais aussi de diverses conditions environnementales telles que les habitudes de vie ou les facteurs nutritionnels.

Les molécules disponibles et les stratégies utilisées dans le traitement de la MA permettent d'améliorer ou ralentir très modestement et transitoirement les symptômes de cette pathologie, mais en aucun cas de la stopper ni *a fortiori* de la guérir. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce déficit thérapeutique, comme les difficultés diagnostiques et la prise en charge trop tardive des malades, au moment où les dégâts associés aux processus neurodégénératifs sont massifs et irréversibles. Une autre explication serait que même si la MA implique la survenue d'événements particuliers qui la distinguent fondamentalement du vieillissement cérébral sans pathologie, il est probable que les modifications accumulées au cours du temps favorisent le développement de la maladie. Une meilleure connaissance des processus de vieillissement s'avère donc primordiale, tout comme l'établissement de modèles réellement adaptés au développement de stratégies thérapeutiques fonctionnelles pour un traitement efficace des individus âgés.

Dans ce contexte général, les aspects préventifs revêtent certainement une importance déterminante pour limiter la prévalence de la MA et la recherche fondamentale doit encore progresser pour identifier les mécanismes impliqués dans le vieillissement pathologique du cerveau et les leviers thérapeutiques à activer pour en limiter l'occurrence et la portée. Parmi les pistes les plus prometteuses avancées, les facteurs nutritionnels semblent offrir la perspective de paramètres modifiables et contrôlables, en particulier les lipides et les acides gras polyinsaturés *n-3* (AGPI *n-3*), déjà identifiés comme des nutriments capables d'influer sur d'autres pathologies liées au vieillissement comme les maladies cardiovasculaires ou métaboliques.

Ce travail de thèse ambitionne donc d'explorer chez la souris à différents âges l'impact de régimes alimentaires de composition lipidique variée sur les propriétés structurales des membranes neuronales, ainsi que sur les fonctionnalités des protéines qui leur sont associées. L'objectif ciblé par ces études est d'avancer des éléments robustes en faveur de la nécessité de préserver des propriétés fonctionnelles des membranes cérébrales lors du vieillissement. L'intérêt de stratégies nutritionnelles basées sur une supplémentation en AGPI *n-3* sera évalué afin de favoriser les réponses protectrices conservant aux neurones leur capacité de diminuer leur susceptibilité au stress amyloïde impliqué dans la MA et de prévenir l'apparition des troubles cognitifs associés.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Du vieillissement biologique au vieillissement pathologique

Le vieillissement connaît plusieurs définitions selon les sources et le contexte. Pour nombre d'entre elles et de manière générale dans la société, le vieillissement est associé à un critère d'âge. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) retient ainsi l'âge de 65 ans et plus, tandis qu'une interprétation sociale, basée sur la mentalité collective, utilise plutôt l'âge de cessation d'activité professionnelle. Selon ces critères, en France, le vieillissement débiterait en moyenne à 57 ans. D'après le Collège National des Enseignants de Gériatrie (CNEG), le vieillissement correspond à l'ensemble des processus physiologiques et psychologiques qui modifient la structure et les fonctions de l'organisme à partir de l'âge mûr. Il est la résultante des effets intriqués de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux auxquels est soumis l'organisme tout au long de sa vie. Il s'agit d'un processus lent et progressif qui doit être distingué des manifestations des maladies. L'état de santé d'une personne âgée résulte habituellement des effets du vieillissement et des effets additifs de maladies passées (séquelles), actuelles, chroniques ou aiguës (CNEG, 2010). Pour ces services destinés aux personnes âgées, l'âge mûr de 75 ans semble pertinent. Néanmoins, l'âge moyen constaté dans les services gériatriques est encore plus tardif puisqu'il est d'environ 85 ans (OMS, 2012a). Pour les spécialistes de l'étude du vieillissement, la notion d'âge n'est pas un bon critère de définition et ils font plutôt appel aux aspects biologiques et physiologiques en le décrivant comme un « processus par lequel un organisme subit une série de transformations entraînant la dégénérescence de certaines cellules, ce qui provoque l'affaiblissement et le ralentissement des fonctions vitales et des modifications d'ordre physique, physiologique et psychique » (Cassou, 1997 ; Henrard, 1997). Cette définition rejoint celle donnée par le dictionnaire Larousse qui décrit le vieillissement comme « un ensemble de processus physiologiques et psychologiques qui modifient la structure et les fonctions de l'organisme. Il est le résultat de facteurs génétiques (intrinsèques) et environnementaux (extrinsèques) auxquels l'organisme est soumis tout au long de sa vie ». Au cours de ces travaux, nous avons fait le choix de définir le vieillissement selon les critères du dictionnaire en gardant en mémoire qu'il s'agit d'un phénomène dynamique et relatif dans lequel l'environnement joue un rôle important et dont le principal agent pro-vieillescence est l'accumulation du temps qui passe. Cette accumulation rend compte du vieillissement en tant qu'état biologique du corps humain qui se distingue de manifestations pathologiques. Lorsque ces accumulations de transformations atteignent un certain seuil, le vieillissement n'est plus un état « normal » mais s'associe à des manifestations cliniques potentiellement pathologiques. C'est pourquoi au cours de cette thèse nous distinguerons le vieillissement biologique, qui est le vieillissement « normal » que nous subissons tout au long de notre vie, du vieillissement pathologique pour lequel des maladies sont associées.

Actuellement, les études montrent que l'espérance de vie ([Tableau I](#)) et la longévité ([Tableau II](#)) augmentent régulièrement en France. Mais en parallèle, cette même population vit moins longtemps en bonne santé. En effet, la tendance récente de l'espérance de vie sans incapacité semble être moins

favorable que dans le passé, puisqu'elle recule depuis quelques années. D'après les chiffres publiés par l'Institut National d'Études Démographiques (INED), l'espérance de vie sans incapacité est passée en France de 64,6 et 62,7 ans en 2008 à 63,5 et 61,9 ans en 2010, respectivement pour les femmes et les hommes (INED, 2011, 2012). Ces chiffres suggèrent deux niveaux de réflexion : (1) ils indiquent clairement que la prévention reste largement négligée par les politiques de santé publique, au contraire des traitements médicaux qui permettent de repousser l'âge du décès, un choix qui n'est pas sans conséquences budgétaires ; (2) la quantité de vie semble privilégiée au détriment de la qualité de vie des seniors dont nous savons que la santé et l'autonomie sont des éléments déterminants de la perception du bien-être et du bien-vieillir.

Tableau I : Évolution de l'espérance de vie à la naissance en France depuis 1789

(d'après INSEE, statistiques de l'état civil, estimations de population, 2011)

Sexe / Année	1789	1900	1955	1980	1990	1998	2020
Masculin	28,0	45,0	65,0	70,2	72,7	74,6	77,0
Féminin	28,0	49,0	72,0	78,4	80,9	82,2	86,4

L'espérance de vie à la naissance en France a considérablement augmenté en un quart de siècle. Au 1^{er} janvier 2011, l'espérance de vie à la naissance en France métropolitaine était de 78,5 ans pour les hommes et de 84,9 ans pour les femmes. Les projections pour 2020 risquent donc d'être revues à la hausse.

Tableau II : Évolution de l'espérance de vie à 60, 75 et 85 ans en France depuis 1950

(d'après INSEE, statistiques de l'état civil, estimations de population, 2011)

Sexe	Âge	1950	1980	1990	2000	2010	2020
Masculin	60	15,4	17,3	19,0	20,3	21,6	22,8
	75	7,0	8,3	9,4	10,1	10,8	11,6
	85	3,7	4,5	4,9	5,2	5,6	5,9
Féminin	60	18,4	22,4	24,2	25,7	27,1	28,4
	75	8,4	10,7	12,0	13,0	14,0	14,9
	85	4,4	5,4	6,0	6,5	7,1	7,6

Au cours du siècle précédent, l'espérance de vie, à un âge donné, chez les personnes âgées n'a cessé de croître. Au 1^{er} janvier 2011, l'espérance de vie à 60 ans en France métropolitaine était de 22,7 ans pour les hommes et de 27,2 ans pour les femmes.

Le vieillissement rapide de la population, en particulier dans les pays industrialisés, et l'accroissement de l'espérance de vie et de la longévité ces dernières décennies ont mené à reconsidérer l'importance de ce phénomène et le concept de « bien-vieillir » connaît aujourd'hui un regain d'intérêt.

A. Le vieillissement de la population en quelques chiffres

Le vieillissement est un phénomène planétaire. Selon l'OMS, la population des 60 ans et plus est celle qui augmente le plus vite. Elle aurait doublée depuis 1980 et devrait atteindre deux milliards d'ici 2050 (Figure 1). Le pourcentage de cette population mondiale doublera à nouveau entre 2000 et 2050, passant d'environ 11 à 22%. Le nombre de personnes âgées de 80 ans et plus sera, quant à lui, multiplié par quatre durant cette même période pour atteindre près de 400 millions (OMS, 2012a).

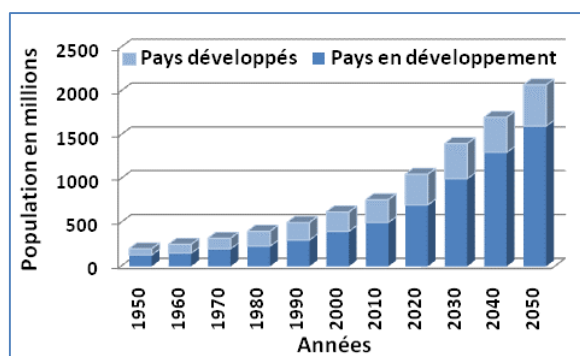


Figure 1 : Population des plus de 60 ans dans le monde depuis 1950

(d'après le Département des affaires économiques et sociales, ONU, 2011)

Le vieillissement de la population mondiale en 2011, sur la base du scénario de projection moyenne de la division de la population (World population prospects : The 2010 revision).

L'INED dans une étude de la géographie du vieillissement en Europe, prévoit une accélération du vieillissement à partir de 2040. La part des 65 ans et plus dans la population dépasserait 20% dans la quasi-totalité des pays et dans la moitié d'entre eux, elle serait supérieure à 25% (Figure 2). Durant la période 2008-2040, la proportion de personnes âgées de 65 ans et plus pourrait être multipliée par plus de 1,5 dans 26 pays sur 29 (INED, 2014). L'institut National de la Statistique et des Études Économiques (INSEE) a étudié l'accroissement du vieillissement en France. En supposant que les tendances démographiques récentes se maintiennent, la France métropolitaine compterait 73,6 millions d'habitants au 1^{er} janvier 2060, soit 11,8 millions de plus qu'en 2007, et un habitant sur trois serait âgé de 60 ans et plus, contre un sur cinq en 2007. En 2060, 23,6 millions de personnes seraient âgées de 60 ans et plus contre 13,2 millions en 2007, soit une hausse de près de 80% en 50 ans. L'augmentation la plus forte concernerait les plus âgés. En effet, le nombre de personnes de plus de 75 ans s'élèverait de 5,2 millions en 2007 à 11,9 millions en 2060 et celui des plus de 85 ans de 1,3 à 5,4 millions. Le vieillissement de la population française s'accroîtrait ainsi jusqu'en 2035, les nombreuses générations issues du baby-boom, nées après la seconde guerre mondiale et avant 1975, auront alors toutes atteint les 60 ans. Entre 2035 et 2060, la part des plus de 60 ans devrait continuer à progresser mais de manière plus modérée. En 2007, la proportion de la population de 60 ans et plus résidant en France métropolitaine représentait 21% et passerait à 31% en 2035 puis à 32% en 2060. L'âge moyen de la population était de 39 ans en 2007 et serait de 43 ans en 2035 et de 45 ans en 2060 (Blanpain and Chardon, 2010).

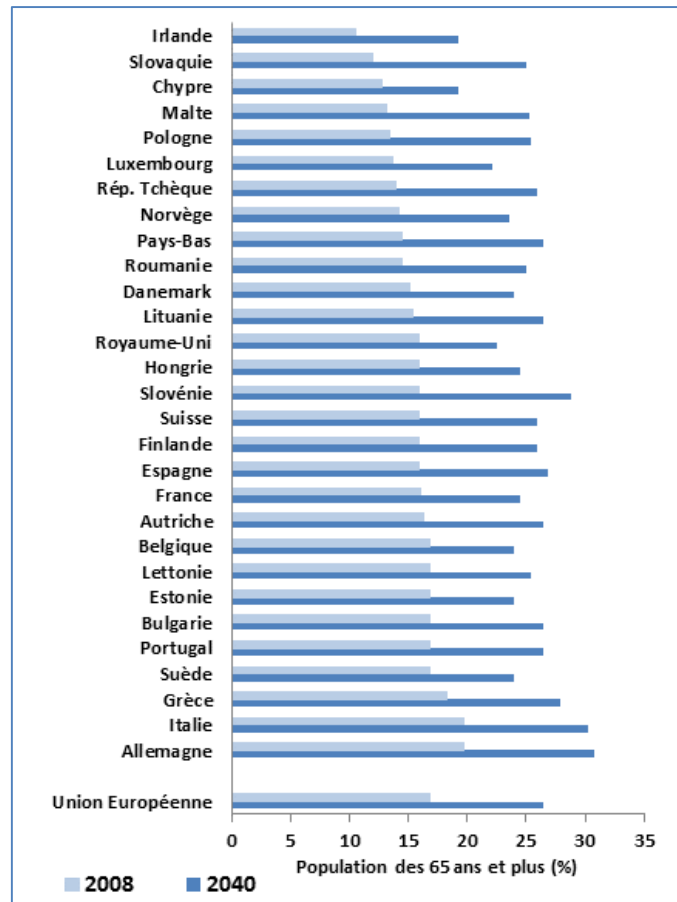


Figure 2 : Proportion des plus de 65 ans en 2008 et prévisions pour 2040 dans 29 pays européens

(d'après INED, 2012)

En 2040, avec environ 31% de personnes âgées de plus de 65 ans, l'Italie et l'Allemagne resteraient toujours en tête, en raison aussi d'une natalité plus faible. À l'autre extrémité de l'échelle se trouveraient majoritairement des pays de l'Europe septentrionale, l'Irlande, le Royaume-Uni, le Luxembourg et la Norvège.

Le phénomène de vieillissement est inéluctable, quel que soit le scénario démographique envisagé (hypothèse migratoire, de natalité ou de mortalité) et l'allongement de la durée de vie dans les années à venir ne fera qu'accroître son ampleur. En effet, même si l'espérance de vie se stabilisait, le nombre de personnes âgées de 60 ans et plus en France augmenterait quand même de 50% d'ici 2050 (Robert-Bobée, 2006 ; Blanpain and Chardon, 2010).

B. Comment caractériser le vieillissement ?

L'augmentation substantielle du nombre de personnes âgées dans notre société constitue un défi pour la biologie et la médecine ainsi que pour les sciences sociales et comportementales. Les processus de vieillissement sont complexes et multifactoriels, ce qui impose d'élucider les mécanismes engagés pour distinguer les effets inhérents au vieillissement des symptômes associés aux maladies. Les progrès de la recherche et de la science en matière d'étude du vieillissement permettent maintenant de différencier le vieillissement biologique du vieillissement pathologique. Trois types de vieillissement ont ainsi pu être décrits (Figure 3) (Rowe and Kahn, 1987, 1997 ; Trivalle, 2004).

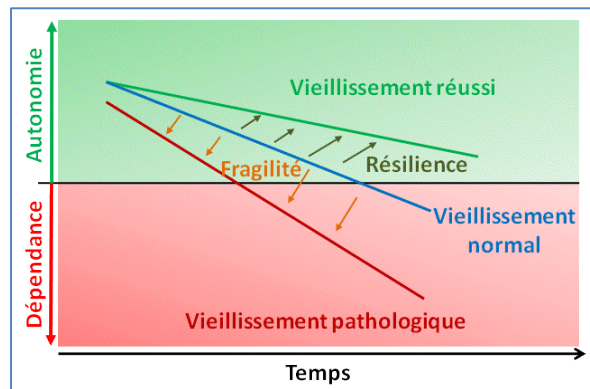


Figure 3 : Trois types de vieillissement fonctionnel

(d'après Trivalle, 2004)

Le vieillissement réussi correspond à une absence ou une perturbation minimale des fonctions physiologiques et à une absence de pathologies. Le vieillissement est dit normal lorsque les atteintes liées à l'âge sont considérées comme physiologiques et en l'absence de maladies définies même si l'avancée en âge peut finir par générer des pathologies et un état de dépendance. Le vieillissement pathologique est associé à des troubles évolutifs ou complexes accélérés, favorisant l'état de dépendance. La résilience représente les capacités adaptatives d'un individu à un facteur de stress tandis que le syndrome de fragilité est un état intermédiaire qui ne permet pas une réponse adaptée à une agression et favorise le vieillissement pathologique.

1. Le concept de « vieillissement réussi »

Selon Rowe et Kahn, le concept de vieillissement réussi se caractérise sur les plans physique, mental et social. Les critères essentiels au succès du vieillissement sont définis comme une absence ou une atteinte très modérée des fonctions physiologiques, un maintien des capacités physiques et cognitives, une absence de pathologies (maladie ou invalidité) et une participation à la vie active (Rowe and Kahn, 1987, 1997). Depuis, d'autres enquêtes ont révélé que les besoins sociaux prenaient une part considérable en tant que facteur de réussite du vieillissement. Cinq caractéristiques ont ainsi été mises en avant : les interactions avec les autres, l'acceptation de soi, l'épanouissement personnel, l'autonomie et l'atteinte des objectifs de vie (Fisher, 1995 ; Lupien and Wan, 2004 ; Le Deun and Gentric, 2007). En effet, des études de cohorte chez les personnes âgées ont montré que si le maintien des fonctions physiques et cognitives et l'absence de maladies étaient positivement associés à la perception de vieillissement réussi, une grande majorité des participants souffrants d'affections chroniques s'auto-classait dans cette même catégorie. Il s'avère ainsi que pour les personnes âgées, la satisfaction de vie est l'élément clé d'un vieillissement réussi, sans corrélation apparente avec les capacités cognitives et indépendamment d'une atteinte par une maladie chronique (Fisher, 1995 ; Strawbridge *et al.*, 2002 ; Gow *et al.*, 2005). Le concept de vieillissement réussi ne peut donc se limiter à l'aspect fonctionnel de l'organisme mais doit aussi englober le contexte social et la qualité de vie de l'individu (Lupien and Wan, 2004 ; Gow *et al.*, 2005 ; Le Deun and Gentric, 2007). Selon les critères envisagés, 12 à 58% de la population âgée pourrait être concernée par le « vieillissement réussi » (Strawbridge *et al.*, 2002 ; Le Deun and Gentric, 2007).

2. Le vieillissement normal : état de résilience ou syndrome de fragilité

De manière générale, le vieillissement est un phénomène complexe et difficile à définir avec précision, se produisant à différents niveaux : moléculaire, cellulaire, physiologique et psychosocial. Le vieillissement dit normal peut être conceptualisé comme un processus d'accumulation de déficits, propre à chaque individu et à chaque organe, dépendant des interactions de facteurs intrinsèques et extrinsèques (Yates, 2002 ; Fulop *et al.*, 2010). En l'absence d'accident ou de maladie grave, le vieillissement biologique normal suit une cinétique lente et ne s'accélère pas avec l'âge entre 30 et 70 ans. Cependant, la fonction et la structure des différents systèmes (cellules, tissus, organes) changent de façon marquée au cours de la vie et présentent une grande hétérogénéité (Yates, 2002). La définition la plus largement admise du vieillissement normal, correspond à une atteinte des réserves physiologiques (capacités physiques et cognitives) tout en maintenant un état fonctionnel acceptable, mais qui ne peut s'adapter à toutes les modifications même mineures (Rowe and Kahn, 1997 ; Fulop *et al.*, 2010). Le vieillissement peut ainsi être associé à des dérégulations homéostatique et homéodynamique progressives qui rendent l'organisme plus sensible aux développements de maladies (Fulop *et al.*, 2010).

La capacité d'un individu à s'adapter à toutes sortes de facteurs de stress, interne ou externe, est appelée résilience et pourrait fournir les clés d'un vieillissement réussi. En effet, les processus engagés dans la résilience contribueraient à maintenir une bonne santé voire même à l'améliorer puisqu'ils permettraient de compenser les incapacités normales apparues au cours du temps. En effet, les dispositions d'adaptation de l'organisme et de l'individu sont primordiales dans le processus de vieillissement (Foster, 1997 ; Lupien and Wan, 2004 ; Le Deun and Gentric, 2007 ; Fulop *et al.*, 2010). Ces mécanismes sont décrits pour être surtout psychologiques, incluant notamment l'humour, l'imagination, la créativité, l'investissement affectif, l'idéalisme, l'engagement et l'altruisme (Le Deun and Gentric, 2007 ; Hanfstingl, 2013).

Il existe à l'opposé de la résilience, un état qui peut s'avérer néfaste, la fragilité. Il s'agit d'une fluctuation intermédiaire entre situation normale et décompensation pathologique. C'est un état d'équilibre précaire avec une impossibilité de réponse adaptée à un stress médical (pathologie aiguë), psychologique (dépression) ou social (isolement), mais où une certaine réversibilité des processus pathologiques peut encore exister (Rockwood *et al.*, 1994 ; Trivalle, 2004 ; Rockwood, 2005 ; Fulop *et al.*, 2010). Cela signifie que, même si le vieillissement prédispose à la fragilité, toutes les personnes âgées ne sont pas pour autant fragiles. Seulement 10 à 20% des personnes de plus de 65 ans sont considérées comme fragiles, mais cette proportion atteint 50% après 85 ans. Cette notion ne fait pas seulement appel à des critères physiques mais englobe des facteurs physiologiques, cognitifs et sociaux qui contribuent à ce syndrome (Trivalle, 2004 ; Fulop *et al.*, 2010). D'un point de vue physiologique, le concept de fragilité est lié aux processus inflammatoires qui se développent au cours du vieillissement et qui peuvent être eux-mêmes liés aux maladies métaboliques, cardiaques et neurodégénératives (Fulop *et al.*, 2010).

3. *Le vieillissement pathologique*

Lorsque le syndrome de fragilité bascule, la décompensation de l'organisme devient pathologique, d'autant plus que la personne est âgée. L'altération de l'état de santé peut se manifester par un ensemble de signes et de symptômes perceptibles directement ou non, qui peuvent correspondre à des troubles généraux ou plus localisés, physiques ou cognitifs, ayant des conséquences fonctionnelles et psychosociales et une progression finale vers un vieillissement pathologique. Ce dernier est alors fréquemment combiné à des maladies sévères évolutives ou compliquées (dépression, démence, troubles moteurs et sensoriels, atteintes cardiovasculaires et métaboliques), associé à un handicap, responsable le plus souvent d'une dépendance et de besoins sanitaires élevés, et qui peut être à l'origine d'un rejet social. Ce contexte pluri-pathologique favorise l'émergence de nouvelles affections aiguës, responsables de l'état de dépendance qui toucherait 10% des plus de 80 ans et 30% des plus de 90 ans (Trivalle, 2004 ; Le Deun and Gentric, 2007 ; Park and Yeo, 2013).

C. Comment expliquer le phénomène de vieillissement biologique ?

Le vieillissement est un processus biologique inévitable qui affecte les êtres vivants et qui est compensé jusqu'à une certaine mesure au niveau de l'organisme mais aussi plus spécifiquement au niveau des tissus et des cellules. Malgré les conséquences négatives liées au processus de vieillissement, la compréhension mécanistique reste limitée. Au cours du temps, de nombreuses théories ont été proposées pour tenter d'en définir les causes.

1. *Les théories génétiques programmées*

Dans les théories génétiques, sont souvent cités le vieillissement programmé ou l'horloge biologique, comme s'il existait un compteur interne à la cellule. Selon ces théories, les liens entre vieillissement et génétique semblent étroits et certains facteurs génétiques pourraient être capables d'influencer la longévité. En effet, des affections génétiques responsables d'un syndrome progéroïde ont été progressivement décrites, mimant partiellement le processus de vieillissement. Les études génétiques et physiopathologiques de ces syndromes ont permis de les classer selon les mécanismes moléculaires mis en cause. Trois groupes principaux peuvent être cités selon les anomalies biochimiques observées : les syndromes progéroïdes liés à des anomalies de la lamine A, comme la progéria ou syndrome de Hutchinson-Gilford, ceux liés aux atteintes des systèmes d'excision et de réparation de l'ADN comme le syndrome de Cockayne, et ceux liés à une instabilité chromosomique comme le syndrome de Werner. La progéria est l'une de ces pathologies les plus connues. Il s'agit d'un trouble génétique progéroïde de l'enfance, caractérisée par un vieillissement accéléré avant l'âge de 1 an. Les enfants atteints semblent naître sans symptôme, mais développent rapidement des caractéristiques de retard de croissance et, entre autres, une apparition retardée de la dentition, une alopecie ainsi qu'une athérosclérose coronaire et

cérébrovasculaire, conduisant à la mort aux alentours de 13 ans (Puzianowska-Kuznicka and Kuznicki, 2005 ; Dereure *et al.*, 2008 ; Ding and Shen, 2008 ; Freije and López-Otín, 2012). Dans ces différents cas, le vieillissement est la résultante des effets de facteurs génétiques.

a. Le vieillissement programmé

Cette théorie affirme que l'héritage génétique détermine en grande partie le rythme du vieillissement et la longévité. C'est dans la structure même de l'ADN que serait inscrite la durée de vie de l'espèce concernée. Les premières études sur le sujet décrivent que le vieillissement serait la conséquence inévitable, mais surtout indirecte, de la sélection naturelle. En effet, l'approche de l'évolution décrit le vieillissement programmé comme utile pour limiter la durée de vie individuelle et libérer ainsi l'espace pour la génération suivante (Merry, 1987 ; Moskalev *et al.*, 2014). Il ferait suite à la différenciation des cellules qui auraient toutes une durée de vie programmée et intégrée variable selon l'espèce. Chaque espèce aurait ainsi sa propre durée de vie moyenne définie depuis la naissance. Cette théorie est étayée par le fait que la durée de vie moyenne chez l'homme ne cesse d'augmenter mais sans changement important pour la durée de vie maximale (Franks, 1972 ; Park and Yeo, 2013). Les chercheurs soutenant cette théorie, pensent que des gènes de sénescence contrôlent les phénomènes liés au vieillissement. Ces gènes dits gérontogènes seraient exprimés à diverses périodes (croissance, développement, sénescence) selon le type cellulaire (Park and Yeo, 2013). Identifiés par l'impact de la perte ou du gain de fonction sur la durée de vie, ils ont été associés à de nombreuses voies de signalisation (insuline, PI3K, TOR), très conservées au cours de l'évolution et impliquées dans la régulation du processus de vieillissement (Bishop *et al.*, 2010 ; Moskalev *et al.*, 2014).

b. L'horloge biologique : le raccourcissement des télomères

La longévité d'une espèce est fortement associée à la durée de vie de ces cellules. Par exemple, des fibroblastes humains, cultivés en continu, ont une capacité de division cellulaire estimée entre 50 et 100 fois. Par conséquent, la durée de vie de ces cellules est considérée comme étant déjà programmée. Il a été rapporté que le raccourcissement des télomères, inévitable à chaque réplication préalable à chaque division, pourrait être responsable de ce phénomène (Park and Yeo, 2013 ; Xi *et al.*, 2013). Découverts en 1978, les télomères sont situés à l'extrémité de chaque chromosome eucaryote. Synthétisés par la télomérase, ils stabilisent les chromosomes (Pommier *et al.*, 1995 ; Garber, 2012 ; Xi *et al.*, 2013). Leur longueur, établie principalement durant la période embryonnaire, est proportionnelle à la durée de vie des cellules mises en culture. Fortement exprimée dans les cellules embryonnaires ainsi que dans les cellules immortalisées et cancéreuses ayant une activité de division très élevée, la télomérase empêche le raccourcissement des télomères (Figure 4) (Counter *et al.*, 1995 ; Pommier *et al.*, 1995).

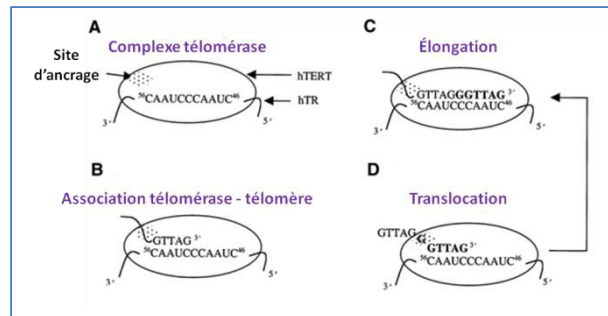


Figure 4 : Action schématique de la télomérase humaine

(d'après Gavory et al., 2002)

La télomérase est nécessaire à la réplication des terminaisons chromosomiques car les ADN polymérase conventionnelles ne sont pas capables de synthétiser les extrémités 5' des brins d'ADN. La télomérase est une transcriptase inverse composée d'une sous-unité catalytique hTERT et d'un brin d'ARN hTR servant de matrice pour l'addition de nucléotides aux séquences répétées, séquences caractéristiques des télomères (A). Une amorce d'ADN se lie à la télomérase par un appariement de bases avec la matrice d'ARN de la télomérase (B). La sous-unité hTERT permet la polymérisation des nucléotides (C, étape d'élongation), puis la télomérase glisse d'une unité vers l'extrémité 3' (D, étape de translocation) pour commencer une nouvelle étape d'élongation.

À chaque cycle de division cellulaire, le chromosome se raccourcit car les répliques sont incapables de synthétiser les extrémités 5' de l'ADN. Ainsi, la perte des télomères peut conduire à des lésions de l'ADN menant à une perte ou une altération de l'information génétique portée par le chromosome. La relation entre sénescence cellulaire et raccourcissement des télomères avec l'âge est maintenant bien établie et de nombreux auteurs considèrent ce raccourcissement comme le facteur fondamental du processus de vieillissement et de l'horloge biologique (Garber, 2012 ; Xi et al., 2013). Par ailleurs, l'altération des télomères active le facteur de transcription p53 qui, en plus de son rôle essentiel dans le blocage du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN, peut se lier aux PGC (*Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator*), coactivateurs transcriptionnels des PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*). Ceci altère la biogenèse et les fonctions mitochondriales, résultant en une chute du métabolisme énergétique et de la production d'ATP, ainsi qu'une accumulation des espèces radicalaires oxygénées (ERO) qui peuvent endommager l'ADN, en particulier les séquences riches en guanine des télomères. Ces dysfonctionnements participent donc à une cascade auto-entretenu d'effets pro-vieillessement (Franks, 1972 ; Sahin and DePinho, 2012).

2. Les théories aléatoires

Outre les théories génétiques, des groupes de chercheurs mettent en avant d'autres théories, dites aléatoires, qui font intervenir les facteurs environnementaux ou tout mécanisme entraînant l'accumulation de produits nocifs ou délétères pour l'organisme, capables de favoriser ou d'accélérer le vieillissement.

a. La théorie de l'erreur catastrophique

Cette théorie découle de la théorie de la mutation somatique qui suppose qu'au cours de la vie, des facteurs environnementaux causent des mutations et des dommages à l'ADN, qui s'accumulent dans

les cellules somatiques, contribuant à favoriser le processus de vieillissement. Ces mutations récessives s'additionnent tout au long de la vie et les variations de longévité pourraient s'expliquer par une tolérance à supporter les dommages à l'ADN propre à chaque individu. Ces erreurs sont partiellement éliminées par les systèmes de réparation dont l'action n'est pas toujours parfaite et qui peuvent eux-mêmes générer leurs propres erreurs (Franks, 1972 ; Park and Yeo, 2013). Le vieillissement serait alors le résultat de dégâts introduits inévitablement dans le procédé de transfert d'informations de l'ADN vers la protéine fonctionnelle (transcription et traduction). La plupart sont sans importance, mais certains pourraient conduire à amplifier une erreur initiale et compromettre la survie de la cellule (Merry, 1987 ; Goldsmith, 2013). Cette théorie semble finalement rejetée, des études ayant montré que l'induction d'erreurs dans la synthèse protéique chez *E. coli* ne conduisait pas à une erreur catastrophique létale mais à un niveau stable d'erreurs n'affectant pas la viabilité (Merry, 1987).

b. La théorie de la glycation non enzymatique des protéines

La glycation non enzymatique des protéines, aussi appelée réaction de Maillard, est une interaction chimique spontanée, irréversible et cumulative entre des oses simples ou leurs dérivés et des protéines tissulaires. Le glucose ou le pentose réagissent spontanément avec les groupements amines des acides aminés pour former une base de Schiff (liaison aldimine C=N instable) sujette à un réarrangement chimique irréversible conduisant aux produits d'Amadori. Ces produits peuvent subir de nombreuses réactions d'oxydation donnant des composés de structures plus complexes (Figure 5), les produits terminaux de glycation avancée ou AGE (*Advanced Glycation End products*) (Takedo *et al.*, 1996 ; Gillery, 2006 ; Shcheglova *et al.*, 2009 ; Tessier, 2010).

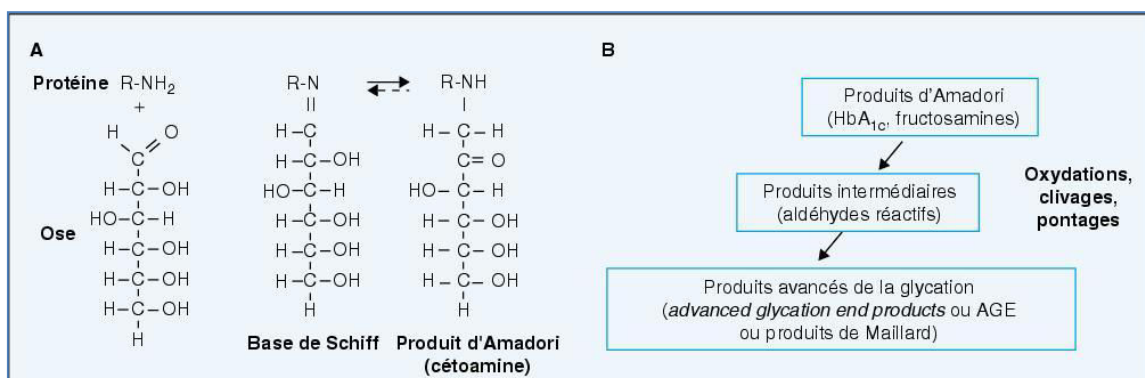


Figure 5 : Exemple schématique de glycation non enzymatique des protéines

(d'après Gillery, 2006)

Le terme de glycation non enzymatique désigne les modifications post-traductionnelles tardives, provoquées par la fixation d'oses simples sur les groupements aminés des protéines. Procédant en plusieurs étapes, la glycation génère premièrement une liaison aldimine instable (base de Schiff), capable de subir le réarrangement moléculaire d'Amadori, conduisant à la formation d'une liaison cétamine stable (A). Les produits d'Amadori résultants sont ensuite oxydés (B) pour former des intermédiaires réactifs (notamment des aldéhydes comme le méthylglyoxal) et aboutissant à des composés de structure complexe, les produits avancés de glycation (AGE).

La glycation modifie la structure des protéines (formation de liaisons croisées, variations d'antigénicité), leurs fonctions (activités enzymatiques ou biologiques), mais également leurs interactions avec les autres biomolécules (Gillery, 2006). Les protéines à durée de vie longue (collagène, élastine, histones) sont bien sûr les plus touchées. La glycation modifie leurs propriétés, les rendant plus résistantes à la protéolyse et empêchant ainsi leur renouvellement. Par exemple, les AGE induisent la formation de pontages moléculaires entre les fibres de collagène, le rendant plus rigide, plus résistant aux protéases et moins soluble, ce qui au cours du vieillissement, contribue à diminuer la communication intracellulaire et l'élasticité des tissus conjonctifs (Edeas *et al.*, 2010 ; Tessier, 2010). La glycation conduit à l'accumulation aléatoire de dommages sur les protéines extracellulaires et peut ainsi impliquer des perturbations des fonctions biologiques, associées au vieillissement physiologique et aux complications des maladies chroniques comme le diabète ou l'athérosclérose (Tessier, 2010). La glycation des lipoprotéines de faible densité (LDL) entraîne par exemple leur accumulation dans le compartiment plasmatique et accentue le risque de maladies cardiovasculaires (Gillery, 2006 ; Edeas *et al.*, 2010).

La plupart des étapes de la glycation s'accompagnent d'un stress oxydant, justifiant le terme de glycoxydation pour désigner l'ensemble du processus. Les altérations structurales des protéines provoquées par la glycation et l'oxydation sont très proches et se potentialisent. En effet, l'oxygène et les réactions d'oxydation accélèrent le processus de glycation. Les AGE qui s'accumulent dans les protéines tissulaires au cours du temps sont des produits de glycoxydation, formés par des réactions de glycation et d'oxydation séquentielles. En résumé, en plus de leurs effets immédiats sur la structure et la fonction des protéines, les AGE induisent un stress oxydant conduisant à la propagation des dommages tissulaires. Ainsi, la glycation des protéines, la production d'AGE et le stress oxydant résultant, accélèrent la réaction de Maillard qui peut initier un cycle auto-catalytique de réactions délétères dans les tissus (Takedo *et al.*, 1996 ; Gillery, 2006). L'hyperglycémie provoque par exemple l'auto-oxydation du glucose et la glycation des protéines. Ces modifications facilitent la production d'ERO et diminuent l'activité des enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase. Ceci induit un stress oxydant qui altère le fonctionnement des mitochondries dont la production d'ATP chute, rendant ces organites incapables de dégrader le glucose ou les lipides qui s'accumulent, favorisant d'autant la glycation (Edeas *et al.*, 2010).

Les AGE pourraient aussi avoir d'autres effets, en liant des récepteurs spécifiques présents sur les monocytes, les macrophages ou les cellules endothéliales et en stimulant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ou de facteurs de croissance. Le récepteur le plus connu est RAGE (récepteurs aux AGE), exprimé à la surface de nombreuses cellules comme les cellules endothéliales et musculaires lisses, les lymphocytes, les monocytes, les polynucléaires et les neurones. La fixation des AGE sur RAGE déclenche une signalisation induisant un stress oxydant intracellulaire et l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (Gillery, 2006 ; Shcheglova *et al.*, 2009 ; Edeas *et al.*, 2010).

c. La théorie des radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomes, fragments de molécules ou molécules indépendantes, produits au cours du métabolisme de l'oxygène, dans lesquels une paire d'électrons a été séparée en deux électrons libres. Ces propriétés en font des espèces hautement réactives, très instables et de courtes durées de vie, capables d'initier une réaction en chaîne avec des molécules stables pour générer d'autres ERO. En effet, un radical libre aspire à capturer d'autres électrons pour devenir plus stable et ainsi se réduire en oxydant d'autres composés. La réactivité de ces radicaux varie selon la molécule considérée mais ils sont globalement de puissants oxydants dont les principaux sont les radicaux superoxyde (O_2^{\bullet}) et hydroxyle (OH^{\bullet}), ainsi que d'autres dérivés de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le peroxinitrite (NO_3^{\bullet}) (Mc Daniel, 2013).

La nature très réactive des ERO et leur production dans toutes cellules entraîne des dommages généralisés. La majorité de ces ERO est produite au niveau mitochondrial, dans la chaîne de transport des électrons, par la fuite d'électrons qui réagissent avec l'oxygène libre de la matrice. Les membranes des mitochondries et du réticulum endoplasmique (RE), contenant des enzymes telles que la monoamine oxydase ou des cytochromes oxydases, sont donc particulièrement vulnérables à l'oxydation (Merry, 1987 ; Le Deun and Gentric, 2007). La réactivité et la nocivité des ERO sont avérées vis-à-vis de toutes les biomolécules, en particulier l'ADN mitochondrial dont les mutations contribueraient à l'obtention d'un phénotype de sénescence. L'accumulation de mutations serait d'ailleurs associée à une durée de vie raccourcie et à un vieillissement prématuré (Hall, 1972 ; Merry, 1987 ; Ureshino *et al.*, 2014). En effet, si les dommages des radicaux libres sur l'ADN ne sont pas complètement réparés, il en résulterait une expression génique réduite et à terme une mort cellulaire. Les mitochondries sont d'autant plus sensibles à ce type de dégâts qu'elles sont dépourvues d'enzymes de réparations de l'ADN (Merry, 1987 ; Le Deun and Gentric, 2007 ; Park and Yeo, 2013).

Les fonctions mitochondriales semblent donc avoir une influence importante sur les processus de vieillissement et avoir des effets négatifs ou positifs sur la durée de vie en fonction du contexte (Bishop *et al.*, 2010). Chez l'homme, le singe et les rongeurs, des mutations ponctuelles et des délétions dans l'ADN mitochondrial s'accumulent dans un grand nombre de tissus au cours du vieillissement. Ces mutations sont inégalement réparties et peuvent concerner d'avantage certaines cellules où une multitude de déficits de la chaîne respiratoire peuvent se produire, notamment dans des organes tels que le cœur, les muscles ou le cerveau (Trifunovic *et al.*, 2004 ; Houtkooper *et al.*, 2011). Pour illustrer ce phénomène, une étude a montré l'impact de ces mutations sur l'organisme en utilisant une souris déficiente en PolgA, la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase Polg mitochondriale (Trifunovic *et al.*, 2004). Cette polymérase, PolgA, est spécifique de l'ADN mitochondrial (ADNmt) et permet sa réplication ainsi que la correction des erreurs survenues lors de cette réplication. La forme mutée de la PolgA permet une réplication normale de l'ADNmt mais ne corrige plus les erreurs de réplication, ce qui chez ce modèle de souris, augmente de 3 à 5 fois le nombre de mutations ponctuelles de l'ADNmt (Foury and Vanderstraeten, 1992 ; Rötig, 2004). Ces

augmentations sont associées à une réduction de la durée de vie des animaux et à l'apparition prématurée d'un phénotype lié au vieillissement (Figure 6) qui se caractérise par une perte de poids, une réduction de la graisse sous-cutanée, une alopecie, une cyphose, une ostéoporose, une anémie, une diminution de la fertilité et un épaissement des parois cardiaques. Ces résultats font la preuve d'un lien de causalité entre les mutations de l'ADNmt et le phénotype de vieillissement (Trifunovic *et al.*, 2004).

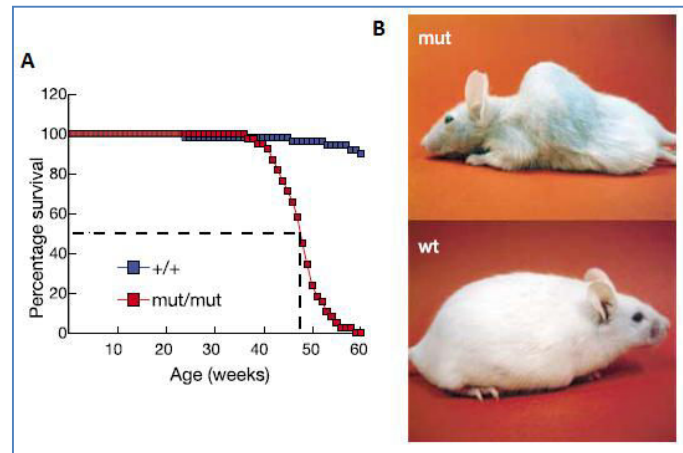


Figure 6 : Phénotype lié au vieillissement chez la souris mutante pour la protéine PolgA

(d'après Trifunovic *et al.*, 2004)

(A) La courbe de survie des souris de type sauvage (+/+, N=50) est représentée en bleu et celle des souris mutantes pour la protéine PolgA (mut/mut, N=38) est en rouge. À l'âge de 50 semaines, plus de la moitié des effectifs est perdue pour le groupe de souris mutées. (B) Les souris portant la mutation (mut) présentent une masse corporelle et une taille réduite, une courbure de la colonne vertébrale et une perte importante de poids en comparaison avec la même portée de souris de type sauvage (wt) à l'âge de 40 à 45 semaines.

Dans certaines circonstances, une réduction modérée des fonctions mitochondriales peut augmenter la durée de vie par l'induction d'une résistance au stress oxydant. En effet, chez la souris, la diminution de l'activité du coenzyme Q7 (CoQ7 ou ubiquinone) ou du complexe cytochrome C oxydase, composants de la chaîne de transport des électrons, suffit à augmenter la durée de vie (Bishop *et al.*, 2010). Ces mêmes effets ont été observés en conséquence de l'expression accrue de la catalase mitochondriale. L'explication commune réside au niveau de la réduction des taux d'ERO produits par la chaîne de transport des électrons (Bishop *et al.*, 2010). En effet, les dysfonctionnements cellulaires associés au vieillissement chez les mammifères sont attribuables à l'augmentation de la production d'ERO, mais aussi à l'accumulation des ERO suite à l'altération des capacités antioxydantes. Bien que les ERO soient produits dans de multiples sites, la chaîne de transport mitochondrial d'électrons est considérée comme le premier producteur d'ERO et donc comme la principale source de stress oxydant dans les cellules (Figure 7).

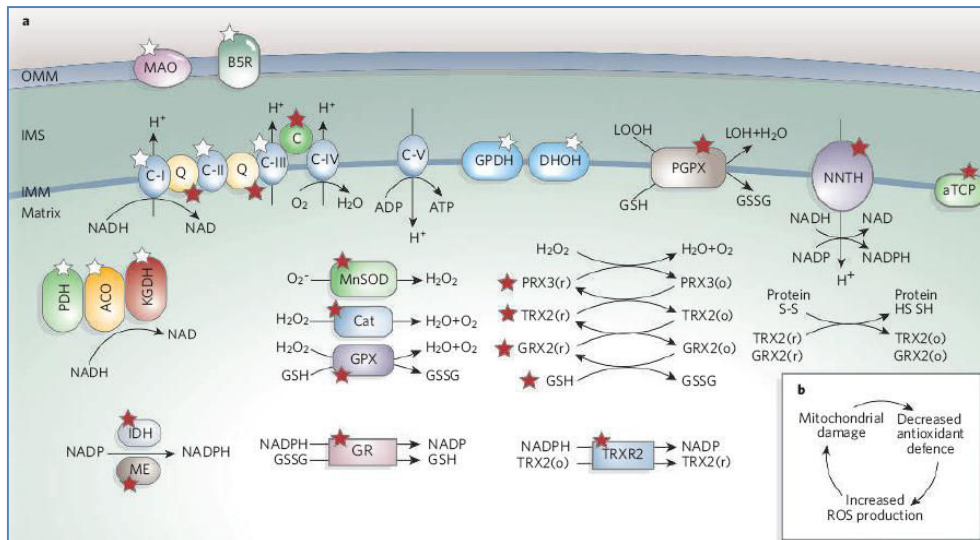


Figure 7 : Rôle de la mitochondrie dans la production d'espèces radicalaires oxygénées

(d'après Lin and Beal, 2006)

Les processus et les composants impliqués dans la génération d'espèces réactives oxygénées (ERO) sont représentés par des étoiles blanches et ceux de la défense antioxydante par des étoiles rouges. Les mitochondries sont les principaux consommateurs cellulaires d'oxygène et contiennent de nombreuses enzymes redox capables de transférer des électrons libres à l'oxygène, générant des radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). Jusqu'à présent, les enzymes mitochondriales connues pour produire des ERO comprennent les enzymes du cycle de Krebs comme l'aconitase (ACO), l'α-cétoglutarate déshydrogénase (KGDH), la chaîne de transport des électrons comprenant les complexes I, II et III, la pyruvate déshydrogénase (PDH), la dihydroorotate déshydrogénase (GPDH), la dihydroorotate déshydrogénase (DHOH), les monoamines oxydases (MAO) et la cytochrome b5 réductase (B5R). Le transfert d'électrons vers l'oxygène est plus probable lorsque les transporteurs redox sont abondamment chargés et que l'énergie potentielle de transfert est élevée. La production d'ERO est diminuée lorsque les électrons disponibles sont rares. Les mitochondries contiennent également des systèmes de défense antioxydante très variés pour détoxifier les ERO générées par les réactions décrites ci-dessus. Ces systèmes de défense comprennent des composants non enzymatiques comme l'α-tocophérol (ATCP), le coenzyme Q10 (Q), le cytochrome c (C) et le glutathion (GSH) ainsi que des composants enzymatiques tels que la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD), la catalase (Cat), les glutathion peroxydases (GPX et PGPX), la glutathion réductase (GR), les peroxyrédoxines (PRX3/5), la glutarédoxine (GRX2), la thiorédoxine (TRX2) et la thiorédoxine réductase (TRXR2). La régénération de glutathion et de thiorédoxine par des réductases spécifiques (GR et TRXR2) est dépendante du NADPH, cofacteur dérivé des substrats isocitrate déshydrogénases (IDH), de l'enzyme malique (ME) ou de la nicotinamide nucléotide transhydrogénase (NNTH). Comme pour la génération d'ERO, les défenses antioxydantes sont liées à l'oxydoréduction et à l'état énergétique des mitochondries. Les dommages mitochondriaux accompagnés d'une diminution de la capacité des défenses antioxydantes sont des conditions préalables pour la production d'ERO. Lorsque cela se produit, un cercle vicieux s'ensuit, dans lequel l'équilibre entre capacités antioxydantes et production d'ERO est rompu, rendant les mitochondries toujours plus susceptibles.

L'ADN et les protéines ne sont pas les seules molécules affectées par l'oxydation puisque les lipides y sont particulièrement sensibles eux aussi. La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès que l'oxygène présent touche l'intégralité des lipides contenant des acides gras (AG) insaturés quelle que soit leur origine. L'auto-oxydation des AG insaturés (AGI) peut se faire par l'oxygène triplet (3O_2) ou singulet (1O_2). Dans le cas de l'oxygène triplet, la réaction se déroule en trois étapes. La phase d'initiation consiste à éliminer un atome d'hydrogène situé sur un carbone placé entre deux doubles liaisons de l'AG, menant à la formation d'un radical alkyle. Lors de la propagation, ce radical alkyle réagit rapidement avec 3O_2 pour donner un radical peroxyde. La réaction suivante, plus lente, permet le transfert d'un atome d'hydrogène présent sur une molécule d'AG voisine pour former un hydroperoxyde. L'AG venant de perdre son hydrogène est alors transformé en radical alkyle qui entre à son tour dans un cycle de réaction avec 3O_2 pour donner un radical peroxyde. Au cours de cette phase de propagation, il a été calculé que l'initiation de la peroxydation par un radical entraîne l'oxydation d'environ 25 autres molécules d'AG. Après l'atteinte de la vitesse maximale d'oxydation, celle-ci diminue par combinaison avec d'autres radicaux lipidiques pour former des produits non radicalaires. L'auto-oxydation des AGI par 1O_2 , quant à elle, se fait par addition directe de 1O_2 sur la double liaison de l'AG pour donner des hydroperoxydes qui, par dégradation en

radicaux libres, servent surtout d'initiateurs à la réaction d'auto-oxydation par $^3\text{O}_2$. Les produits de l'oxydation des AG contribuent ainsi à propager les dommages vers d'autres molécules comme les protéines, les acides nucléiques et d'autres lipides. De ce fait, les conséquences sont importantes et il semble clair que la peroxydation des lipides cellulaires joue un rôle de relais et d'amplification des dommages directement causés par les ERO et décrits précédemment (Maziere, 1997 ; Cillard and Cillard, 2006 ; Negre-Salvayre *et al.*, 2008).

Du fait de la complexité du vieillissement et de la diversité des facteurs mis en cause, de nombreuses théories n'ont cessé d'être proposées pour expliquer ce phénomène (théories neuroendocrinienne, immunologique, de la réticulation, de l'usure, du niveau de vie, etc.). Il est tentant de supposer qu'une accumulation progressive de dommages cause le vieillissement d'un organisme, mais d'autres processus biologiques présents au cours de la vie, qu'ils soient programmés ou non, pourraient contrôler le type et la vitesse de vieillissement. Globalement, nous pouvons résumer la situation en considérant le vieillissement comme le résultat de réactions d'oxydation, de perturbations moléculaires, de dommages mécaniques et d'autres processus naturels pouvant entraîner une détérioration des systèmes biologiques. Il s'agit d'un phénomène plurifactoriel dont aucun mécanisme biologique ne semble pouvoir expliquer à lui seul l'intégralité des conséquences. D'ailleurs, de nombreuses études ont tenté d'identifier des biomarqueurs du vieillissement mais jusqu'à présent aucune n'a permis d'apporter une réponse universelle. Par exemple, une étude menée sur une cohorte de 84 hommes et de 41 femmes en bonne santé pratiquant un exercice physique et âgés de 55 à 79 ans a montré un certain degré de corrélation entre l'âge et le débit maximum d'oxygène consommé lors d'un effort. Cependant, cet indice physiologique ne peut être considéré comme un biomarqueur du vieillissement car l'association statistique peut être influencée par la taille de l'échantillon, des facteurs génétiques et la capacité d'entraînement. Enfin et surtout ce marqueur n'a pu identifier avec précision l'âge de n'importe quel individu donné, ce qui représente pourtant la première nécessité de tout biomarqueur utile du vieillissement. D'autres indices physiologiques ont été évalués tels que la densité minérale osseuse, la pression artérielle, la force musculaire, les fonctions métaboliques et endocriniennes mais n'ont pas abouti à l'identification d'un biomarqueur. Ces observations soulignent la complexité de l'identification d'un biomarqueur physiologique qui pourrait être utilisé de manière fiable pour prédire l'âge d'un individu donné, même sur une cohorte homogène de personnes saines et actives (Pollock *et al.*, 2015). Le processus de vieillissement biologique, même lorsqu'il est exempt de facteurs de confusion (cohorte homogène), est donc susceptible d'être très individualiste et complexe.

D. Les mécanismes biologiques du vieillissement cérébral

Le cerveau est une structure extrêmement complexe dont le fonctionnement particulier est à la fois isolé et dépendant du système périphérique. Ainsi l'inflammation, les radicaux libres ou les changements hormonaux sont tous des mécanismes associés au vieillissement du tissu cérébral. Celui-ci est aussi soumis à l'influence néfaste de facteurs comme les maladies métaboliques, les traumatismes crâniens ou un stress chronique. Anatomiquement et fonctionnellement, le cerveau subit lui aussi des modifications au cours du temps.

1. Modifications neurobiologiques du cerveau vieillissant

Lors du vieillissement, le système nerveux central (SNC) supporte des modifications neurobiologiques et notamment une diminution de la masse cérébrale. Initialement, cette réduction avait été associée à un déficit neuronal massif. Depuis, des études prétendent que l'atrophie cérébrale pourrait résulter de la perte du volume des neurones et de leurs dendrites (Burke and Barnes, 2006 ; Bishop *et al.*, 2010 ; Bartrés-Faz and Arenaza-Urquijo, 2011 ; Park and Yeo, 2013). Lorsque cette atrophie se manifeste, elle n'atteint pas les régions cérébrales de manière uniforme. Le lobe temporal médian, où se trouve l'hippocampe, et le lobe frontal, deux structures importantes pour la mémoire, sont particulièrement affectées (Burke and Barnes, 2006 ; Andrews-Hanna *et al.*, 2007 ; Park and Yeo, 2013). Les altérations neuronales qui en résultent peuvent mener à une baisse des concentrations de certains neurotransmetteurs comme l'acétylcholine (ACh), l'acide γ -aminobutyrique (GABA) ou la dopamine (Mora *et al.*, 2008 ; Bishop *et al.*, 2010). La substance grise, contenant les corps cellulaires neuronaux, n'est pas la seule touchée, puisque la substance blanche subirait également des détériorations dans sa structure et dans sa densité en myéline (Head *et al.*, 2004 ; Salat *et al.*, 2005 ; Andrews-Hanna *et al.*, 2007 ; Bishop *et al.*, 2010). Il a par exemple été décrit un amincissement des faisceaux d'axones dans les lobes frontaux, pariétaux et temporaux (Pfefferbaum *et al.*, 2000 ; Cabeza *et al.*, 2002 ; Pfefferbaum *et al.*, 2005 ; Andrews-Hanna *et al.*, 2007 ; Bishop *et al.*, 2010 ; Bartrés-Faz and Arenaza-Urquijo 2011). Il a aussi été noté une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) avec l'âge. L'augmentation des métalloprotéases matricielles (MMP2 et MMP9) est responsable de la dégradation des composants de la matrice extracellulaire et l'augmentation de leurs activités contribue à sa perméabilité et à l'expansion de ses dysfonctionnements. La diminution des ARNm de claudine-5, composant des jonctions serrées, est associée à une réduction de la fonctionnalité de la BHE (Lee *et al.*, 2012).

Même en l'absence de pathologies, le vieillissement cérébral s'accompagne d'un déclin cognitif. Si les fonctions motrices et sensitives sont relativement peu atteintes, le vieillissement des organes sensoriels (vue, odorat, ouïe) peut entraver la saisie des stimuli externes et ainsi avoir des répercussions sur les capacités cognitives de la personne âgée et en accentuer la détérioration (Gély-Nargeot *et al.*, 2000 ; Park and Yeo, 2013). Parmi les fonctions déclinantes avec l'âge, la mémoire est la plus souvent citée. Cependant,

le niveau de déficit varie selon les études. Des données épidémiologiques sur la prévalence des troubles mnésiques en France sur une cohorte de 1.503 sujets âgés de plus de 65 ans décrivent que 60,8% d'entre eux ressentent des troubles de la mémoire, dont 15,6% en ont fait part à leur médecin (Dartigues *et al.*, 1997). D'autres analyses sur la prévalence du déclin cognitif associé au vieillissement présentent que 26,6% des sujets âgés de 68 à 78 ans (24,4% chez les femmes et 30,1% chez les hommes) remplissent les critères de déclin cognitif (examen de l'attention, des fonctions verbales et visuelles) (Hanninen *et al.*, 1996). Une autre étude sur un échantillon de personnes âgées de 50 à 95 ans donne un taux de prévalence pour les troubles cognitifs de 18,5% (Barker *et al.*, 1995). Les différences observées dans les proportions de personnes atteintes de troubles mnésiques ou cognitifs peuvent s'expliquer par la difficulté à appréhender les processus de vieillissement. Malgré cela, toutes ces études s'accordent sur le lien entre déclin des performances mnésiques et facteurs environnementaux et psychologiques (âge, éléments psychoaffectifs, éducation, personnalité, etc.) (Barker *et al.*, 1995 ; Hanninen *et al.*, 1996 ; Dartigues *et al.*, 1997 ; Gély-Nargeot *et al.*, 2000 ; Derouesné *et al.*, 2004). Parmi ces facteurs, la réserve cognitive pourrait jouer un rôle essentiel. Celle-ci se réfère à la capacité du cerveau à faire face aux pathologies dans le but de minimiser la symptomatologie. Selon les hypothèses avancées, cette réserve peut se définir par un nombre de synapses ou un volume cérébral important, ce qui conférerait au cerveau une capacité particulière et prolongée à supporter les processus neuropathologiques. Elle peut également être décrite comme le reflet de la capacité individuelle à utiliser les processus cognitifs et les réseaux neuronaux d'une manière efficace. En effet, une réserve de neurones permettrait aux individus en bonne santé de faire face aux tâches exigeantes et d'être moins sensibles aux perturbations. Elle pourrait aussi favoriser une plus grande plasticité et en conséquence le phénomène de compensation permettant d'adopter de nouveaux réseaux neuronaux pour faire face au vieillissement ou aux pathologies neurodégénératives (Stern, 2002 ; Bartrés-Faz and Arenaza-Urquijo, 2011 ; Tucker and Stern, 2011).

Plusieurs formes de mémoire seraient affectées par l'âge, comme la mémoire dite incidentelle, permettant de retenir automatiquement et sans effort, la mémoire de travail, permettant de maintenir des informations pendant un temps court, mais aussi la vitesse de traitement et de récupération des données. Les altérations mnésiques liées à l'âge se manifesteraient alors par une augmentation du temps de réponse ou de réaction et par une diminution de la capacité à acquérir ou mémoriser de nouveaux éléments (Blalock *et al.*, 2003 ; Burke and Barnes, 2006 ; Vandenberghe *et al.*, 2014). Chez la personne âgée, la capacité de concentration est également diminuée et l'abstraction de détails contextuels est plus ardue. En effet, des examens d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRM) ont mis en évidence des modifications de l'activité neuronale au sein des zones de traitement visuel chez les personnes âgées de 60 à 80 ans, reflétant un traitement de l'information contextuelle au détriment de la mémoire des détails. De plus, lorsqu'il s'agit d'informations à caractère affectif, les personnes âgées éprouvent des difficultés très marquées à surmonter la sélection émotionnelle (Addis *et al.*, 2010 ; Waring *et al.*, 2013). Au cours du

vieillessement cérébral normal, le temps de conduction nerveuse s'allonge tout comme celui de traitement de l'information mais la perte neuronale est souvent lente, minime et compensable jusqu'à un âge avancé.

2. Profil des gènes de la fonction neuronale

L'instabilité génomique et les modifications de l'expression des gènes sont caractéristiques du vieillissement eucaryote. Des analyses transcriptomiques ont permis d'identifier des centaines de gènes subissant des changements d'expression dépendants de l'âge chez la souris, le rat, le singe et l'homme (Figure 8) (Oberdoerffer *et al.*, 2008 ; Bishop *et al.*, 2010). Le vieillissement entraîne une modification de l'expression de gènes impliqués dans diverses fonctions telles que la transmission synaptique, le transport vésiculaire, le renouvellement protéique, la réponse au stress et les réparations de l'ADN, le métabolisme lipidique ou encore la transcription.

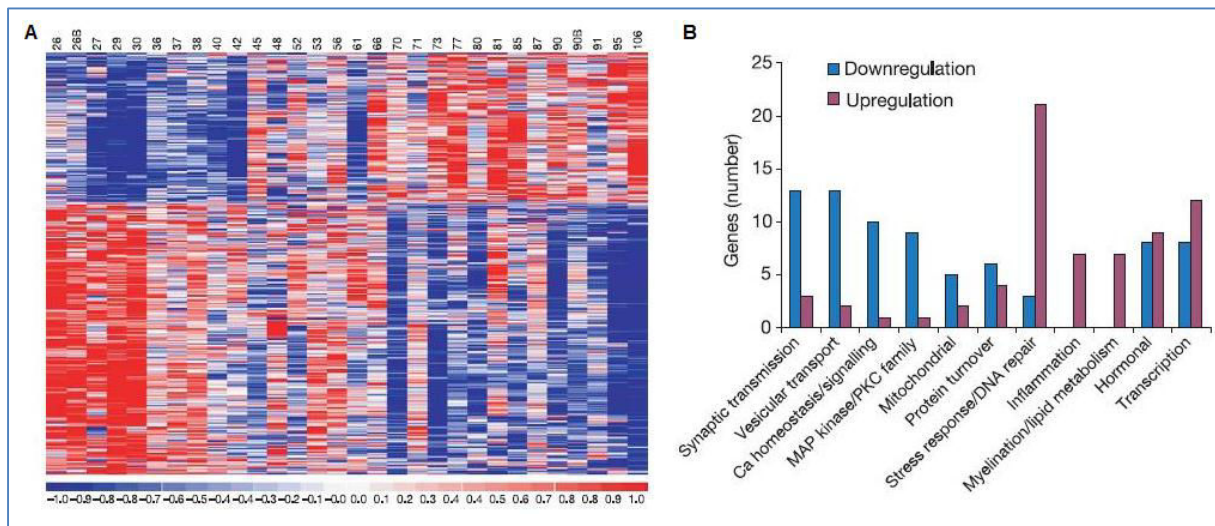


Figure 8 : Modulation de l'expression de gènes par le vieillissement dans le cerveau humain

(d'après Lu *et al.*, 2004)

Le profil transcriptionnel (A) a été établi à partir de cortex préfrontaux de 30 personnes âgées de 26 à 106 ans et a été analysé par une classification hiérarchique des gènes régulés avec l'âge. Deux groupes sont distingués, les gènes dont l'expression est réduite (transition du rouge au bleu) et les gènes dont l'expression est augmentée (transition du bleu au rouge) chez les personnes âgées. L'âge en années est indiqué en haut de chaque colonne. Les valeurs d'expression des gènes sont affichées en fonction de l'échelle de couleurs, dans laquelle le rouge représente une augmentation de l'expression moyenne (upregulation) et le bleu une diminution de l'expression moyenne (downregulation). La lettre B ajouté à côté des âges distingue deux individus du même âge. Les changements relatifs dans l'expression génique ont été classés selon des catégories de fonctions (B). Le vieillissement entraîne une modification de l'expression de gènes impliqués dans, de gauche à droite, la transmission synaptique, le transport vésiculaire, l'homéostasie du calcium, les voies PKC/MAPK, le fonctionnement mitochondrial, le renouvellement protéique, la réponse au stress et les réparations de l'ADN, l'inflammation, la myélinisation et le métabolisme lipidique, les hormones et la transcription.

Une partie significative de ces gènes participe aux fonctions neuronales. Leur expression peut parfois être opposée selon l'espèce observée, ce qui témoigne de la différence d'évolution entre les rongeurs et les primates (Bishop *et al.*, 2010). L'expression génique cérébrale au cours du vieillissement est largement modifiée avec notamment un changement significatif pour les gènes synaptiques (Jiang *et al.*, 2001 ; Lu *et al.*, 2004 ; Erraji-Benchekroun *et al.*, 2005 ; Loerch *et al.*, 2008). En effet, une diminution de l'expression du gène codant pour le neurotransmetteur GABA a été décrite, impactant potentiellement

l'équilibre entre neurotransmission excitatrice et inhibitrice. D'autres gènes subissent le même sort, tels ceux codant pour des facteurs neurotrophiques ou des médiateurs de croissance cellulaire, IGF1 (*Insulin-like Growth Factor 1*), CDK5 (*Cyclin-Dependant Kinase 5*) ou BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*). Des gènes codant pour des protéines synaptiques sont également touchés, comme celles du complexe SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment Receptor*), impliqué dans l'exocytose des vésicules synaptiques. Un second exemple est la protéine synaptotagmine, qui, suite à une stimulation, s'associe au complexe synaptique SNARE à la membrane plasmique pour permettre la fusion des membranes et la libération des neurotransmetteurs dans l'espace synaptique (Jiang *et al.*, 2001 ; Erraji-Benchekroun *et al.*, 2005 ; Bishop *et al.*, 2010).

Pour compléter ces données, de nombreuses études transcriptomiques ont été réalisées sur des cerveaux de rongeurs. Elles ont associée au cours du vieillissement plusieurs altérations de l'expression hippocampique de gènes impliqués dans la plasticité, la synaptogenèse, le remodelage des neurites et la mémoire. Ces dommages se traduisent par une diminution des niveaux de protéines comme Gap43 (*Growth-Associated Protein 43*), protéine cruciale de l'axone et de la membrane présynaptique, Agrine impliquée dans l'agrégation des récepteurs à l'ACh lors de la synaptogenèse, Arc (*Activity-Regulated Cytoskeleton-associated protein*), importante dans les processus de mémorisation ou encore Narp (*Nitrate/nitrite response Regulator Protein*), qui joue un rôle dans la transmission synaptique par son effet sur les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-Méthylisozazol-4-Propionate) du glutamate (Blalock *et al.*, 2003). Il a aussi été rapporté des altérations de l'expression protéique de la dynamine-1, qui permet la fission des vésicules synaptiques, de protéines pré- ou postsynaptiques comme l'hippocalcine, PSD95 (*Postsynaptic Density Protein 95*) et SNAP25 (*Synaptosomal-Associated Protein 25*) et des protéines associées au transport des vésicules synaptiques comme la syntaxine-1, la synaptophysine, les synapsines-1 et -2 et VAMP2 (*Vesicle Associated Membrane Protein*) (VanGuilder *et al.*, 2010). D'autres protéines voient leur expression génique augmenter comme celles impliquées dans les fonctions gliales, telle que la protéine GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) (Jiang *et al.*, 2001 ; Erraji-Benchekroun *et al.*, 2005 ; Bishop *et al.*, 2010), ou dans l'utilisation et le stockage du fer (globine, transferrine, ferritine). Ceci suggère une augmentation de l'utilisation d'oxygène et le développement d'un stress oxydant, d'une réponse inflammatoire ou d'une hyperactivité gliale au cours du vieillissement cérébral (Blalock *et al.*, 2003). Il est également observé une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des protéines de la myéline, notamment des gènes impliqués dans leur transport vésiculaire dans les oligodendrocytes et dans leur dégradation physiologique dans les lysosomes, ce qui pourrait refléter un phénomène de démyélinisation associé au vieillissement. L'expression de gènes de transduction liés à la régulation de calcium, comme celui codant pour la protéine S100A1 (*S100 Calcium Binding Protein A1*) qui induit la libération de calcium, est également augmentée. Or, une augmentation de concentration calcique intracellulaire a pour effet de diminuer l'activité neuronale (Blalock *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces données suggère une détérioration, due au temps, de la neurotransmission dans l'hippocampe et plus généralement dans le cerveau entier. La perte ou la réduction de l'expression de gènes codants pour ces protéines peut entraîner une diminution de la neurotransmission ou de la reconstitution de vésicules durant les stimulations intenses ou prolongées, ce qui est pourtant nécessaire aux processus d'apprentissage et à la formation et au maintien de la mémoire. Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la fonction gliale, la régulation de calcium ou la synthèse de myéline peut participer à l'inflammation et à la diminution de l'activité cérébrale (Blalock *et al.*, 2003 ; Bishop *et al.*, 2010 ; VanGuilder *et al.*, 2010).

3. Accumulation protéique toxique pour le cerveau

L'autophagie est primordiale pour le renouvellement normal des composants cytoplasmiques. Elle joue un rôle particulier dans l'élimination des protéines aberrantes et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, notamment des neurones. L'autophagie constitue un mécanisme régulateur crucial des processus de vieillissement (Meléndez *et al.*, 2003 ; Hara *et al.*, 2006 ; Komatsu *et al.*, 2006 ; Bishop *et al.*, 2010). Des études génétiques chez la souris ont montré que la réduction ou la suppression de l'autophagie neuronale peut conduire à l'accumulation d'agrégats de protéines au cours du vieillissement et mener à terme à la dégénérescence neuronale. La suppression de l'autophagie avec l'âge se produit de manière concomitante à l'accumulation de protéines ubiquitinylées insolubles (IUP), marqueur du vieillissement et de la dégénérescence neuronale (Meléndez *et al.*, 2003 ; Simonsen *et al.*, 2008 ; Bishop *et al.*, 2010). La littérature a décrit divers exemples de ce phénomène chez la souris. D'une part, des mutations dans le gène codant pour la protéine *Atg8a* (*Autophagy-related protein 8*), une ubiquitine ligase nécessaire à l'autophagie, aboutissent à une durée de vie réduite, une accumulation d'IUP et une sensibilité accrue au stress oxydant (Simonsen *et al.*, 2008 ; Bishop *et al.*, 2010). D'autre part, des souris déficientes pour d'autres ubiquitine ligases, comme *Atg7*, dans le SNC, ont des troubles du comportement, des anomalies des réflexes des membres, une réduction de la coordination des mouvements associés à une mort prématurée à 28 semaines. Les carences en *Atg7* entraînent aussi une perte neuronale massive dans le cortex et le cervelet et une augmentation des corps d'inclusions cytoplasmiques dans les neurones au cours du vieillissement (Komatsu *et al.*, 2006). Globalement, les mêmes effets sont observés chez les souris déficientes en *Atg5* dans les cellules neuronales (cortex, hippocampe, cellules de Purkinje), qui développent progressivement des déficits des fonctions motrices accompagnés d'une accumulation dans les neurones de corps d'inclusion cytoplasmiques potentiellement en cause dans le développement de maladies neurodégénératives (Figure 9). La clairance continue des protéines cytosoliques grâce à l'autophagie basale semble donc essentielle pour prévenir l'accumulation anormale de protéines qui peuvent perturber la fonction neuronale et mener, à terme, à des situations pathologiques (Hara *et al.*, 2006).

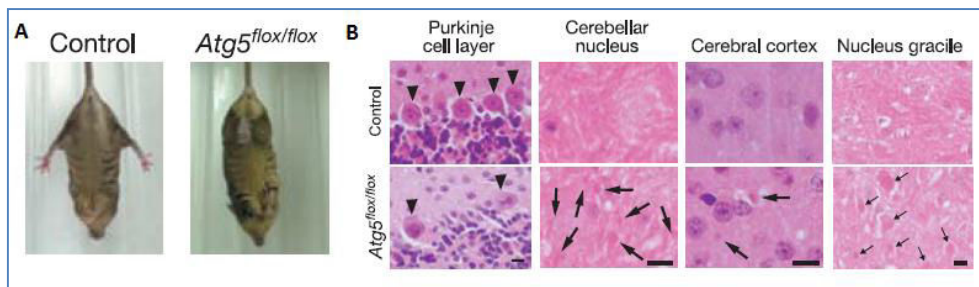


Figure 9 : Anomalie comportementale et dégénérescence neuronale des souris dépourvues de la protéine Atg5 dans le SNC

(d'après Hara *et al.*, 2006)

La protéine Atg5 (Autophagy-related protein 5) est une ubiquitine ligase nécessaire à l'autophagie. Les souris déficientes en Atg5 (*Atg5^{flox/flox}*) dans le système nerveux, subissent des déficits des fonctions motrices comme (A) un défaut d'accrochage des membres lorsqu'elles sont suspendues par la queue contrairement aux souris du groupe contrôle (control) ainsi (B) qu'une accumulation de corps d'inclusion cytoplasmiques dans les cellules neuronales de Purkinje, du cervelet et du cortex (Purkinje cell layer, cerebellar nucleus, cerebral cortex, nucleus gracile). Les cellules de Purkinje sont indiquées par les pointes de flèches et les corps d'inclusion par les flèches.

Dans les cerveaux humains, l'expression du gène *BECN1* de la bécline 1, un régulateur clé de l'autophagie, diminue aussi avec l'âge, ce qui peut accentuer la vulnérabilité des neurones aux effets toxiques des agrégats protéiques. La voie de signalisation de la kinase mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) est le régulateur central de l'homéostasie protéique qui inhibe l'autophagie. Ainsi, réduire la voie mTOR augmente la durée de vie chez les levures, les vers et les drosophiles (Bishop *et al.*, 2010). Chez la souris, une augmentation de l'expression de la protéine Atg8a dans le cerveau étend également la durée de vie moyenne de 56% et favorise la résistance au stress oxydant et à l'accumulation des protéines ubiquitinylées et oxydées. Ces données indiquent que la suppression génétique de l'autophagie est liée à l'accumulation de dommages cellulaires dans les neurones et à la limite de la durée de vie, en revanche, le maintien de l'expression des gènes de l'autophagie restreint l'accumulation des dommages et favorise la longévité (Simonsen *et al.*, 2008).

4. Stress oxydant cérébral

Dans le cerveau humain, les fonctions mitochondriales déclinantes peuvent sélectivement affecter les populations neuronales caractérisées par des besoins bioénergétiques importants, comme les neurones pyramidaux qui dégèrent lors de la MA. Ces neurones possèdent notamment un arbre dendritique très développé qui reçoit un grand nombre de synapses et dont les axones peuvent se projeter à grande distance (Spruston, 2008). Ce déclin des fonctions mitochondriales peut alors contribuer au vieillissement cérébral et rendre les neurones vulnérables aux pathologies liées à l'âge. De plus, l'endothélium des microvaisseaux cérébraux est lui aussi largement exposé à la pression partielle en oxygène et prédispose ces cellules à un stress oxydant préjudiciable. Chez les rats, il a été découvert une perte de la réponse antioxydante dans les microvaisseaux cérébraux avec l'âge. En effet, une diminution des niveaux d'ARN des interleukines IL1 β et IL6 et une augmentation des taux de TNF α , d'IL1 α et d'IFN γ ont été mesurées avec l'âge, ce qui témoigne de processus inflammatoires mis en jeu. L'augmentation du stress oxydant est évidente chez les animaux

âgés et a par ailleurs été mesurée par la formation de groupements carbonyles, présents sur les protéines oxydées, et par la diminution de la MnSOD, enzyme antioxydante catalysant la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène et donc située en première ligne de défense contre les ERO. L'expression des protéines relatives à l'inflammation, au stress oxydant et à la neurotoxicité est, elle aussi, altérée avec l'âge, ce qui suggère que les microvaisseaux puissent contribuer aux dysfonctionnements du cerveau âgé (Williams and Chung, 2006 ; Tripathy *et al.*, 2010).

5. Atteinte de la signalisation insulinique

L'insuline est surtout connue pour son action dans l'homéostasie du glucose périphérique mais elle joue également un rôle au niveau du SNC dans lequel, elle est impliquée dans la survie neuronale et la plasticité synaptique (van der Heide *et al.*, 2006 ; Houtkooper *et al.*, 2011). Chez les mammifères, l'insuline et l'IGF1 sont neurotrophiques et favorisent la survie neuronale en inhibant l'apoptose. Ils peuvent aussi favoriser l'apprentissage et la mémoire dans des modèles animaux et humains (Bishop *et al.*, 2010). Des études ont rapporté que l'insuline augmente les niveaux d' α - et β -tubuline ainsi que les niveaux des ARNm des neurofilaments dans les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y. Ces augmentations concordent avec l'amélioration de la formation des neurites induite par l'insuline dans ces cellules (Mill *et al.*, 1985 ; Wang *et al.*, 2014). D'autres chercheurs ont montré que la pro-insuline *in vitro* a la même capacité à favoriser la survie cellulaire que l'insuline elle-même, et que *in vivo* comme *in vitro*, la signalisation de la pro-insuline est requise pour la survie cellulaire durant des stades de développement spécifiques (Hernández-Sánchez *et al.*, 2002 ; van der Heide *et al.*, 2006).

Durant ces dernières années, il est devenu évident que ces effets sont supportés par une cascade de transduction commune, la voie PI3K, qui favorise la survie en inactivant directement les mécanismes proapoptotiques (Houtkooper *et al.*, 2011). Chez les non vertébrés comme la drosophile ou le nématode, la signalisation de l'insuline est importante pour la croissance neuronale et la migration axonale lors du développement embryonnaire (Dickson, 2003 ; Song *et al.*, 2003). Cette voie est déterminante aussi pour la survie neuronale, la protection contre l'apoptose et contre le stress hypoxique et la toxicité des oxydes d'azote (Matsuzaki *et al.*, 1999 ; Yamaguchi *et al.*, 2001 ; Rodgers and Theibert, 2002). Enfin elle est requise pour l'induction de la potentialisation et de la dépression à long-terme, ainsi que dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. Cela a conduit à l'hypothèse que la voie PI3K fait un lien direct entre apprentissage, mémoire et survie neuronale, expliquant aussi les effets bénéfiques de l'insuline sur la mémoire et sur la manière dont l'activité synaptique peut prévenir la dégénérescence cellulaire (Ngezahayo *et al.*, 2000 ; Sanna *et al.*, 2002 ; Malenka, 2003).

Lors du vieillissement, des changements métaboliques peuvent survenir, comme une atteinte de l'homéostasie glucidique et le développement d'une insulino-résistance causant un diabète (Houtkooper *et al.*, 2011). La stimulation du récepteur de l'insuline (IRS) entraîne l'activation de la voie PI3K/AKT qui a pour cibles la voie GSK3/FOXO, impliquée dans la diminution de la glycogénèse hépatique, et la voie mTOR ayant

un rôle entre autres dans la synthèse de protéines régulant l'apoptose, la croissance et le cycle cellulaire. La résistance à l'insuline est considérée comme un facteur d'alerte pour le développement du diabète de type 2 et est associée à des altérations de la mémoire ainsi qu'à un volume hippocampique réduit. Le nombre de récepteurs à l'insuline diminue d'ailleurs avec l'âge. Les effets bénéfiques de l'insuline ne sont pas encore clairs, mais plusieurs mécanismes pourraient être en jeu. Elle pourrait, par exemple, réguler la production d'ACh, la consommation de norépinephrine et l'expression des récepteurs NMDA du glutamate au niveau des membranes synaptiques (Figure 10) (Williamson *et al.*, 2012).

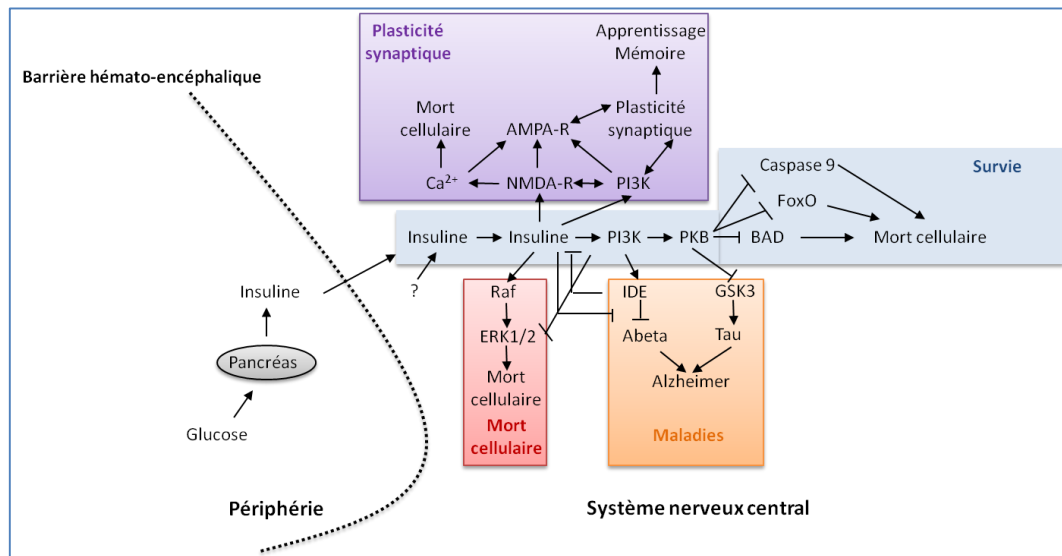


Figure 10 : Récapitulatif des voies de signalisation affectées par l'insuline dans le SNC

(d'après van der Heide *et al.*, 2006)

L'augmentation du taux de glucose périphérique induit la sécrétion d'insuline par le pancréas. L'insuline traverse la BHE pour entrer dans le SNC. Après fixation sur son récepteur, elle y active la voie PI3K qui, par l'activation de PKB/Akt, inhibe plusieurs protéines proapoptotiques (caspase 9, BAD, GSK3 et le facteur de transcription FoxO), ce qui favorise la survie cellulaire. De plus, l'inactivation de GSK3 par PKB entraîne une inhibition des facteurs impliqués dans la MA (Abeta et Tau). L'activation de PI3K inhibe l'activité catalytique de RAS et interrompt ainsi la voie de signalisation ERK1/2, ce qui limite les processus de mort cellulaire. L'activation de la PI3K induit la survie cellulaire, bloque la mort cellulaire et prévient la MA grâce à l'activation de PKB/Akt. Elle peut aussi affecter la plasticité synaptique, vraisemblablement par son action sur les récepteurs NMDA et AMPA, et donc les performances d'apprentissage et mnésiques.

Tous les mécanismes responsables du vieillissement de manière générale, et ceux du vieillissement cérébral en particulier, ne sont pas élucidés. Les progrès de la recherche permettent toutefois, aujourd'hui, de mieux appréhender certains facteurs intervenant dans ce processus. Cette connaissance est indispensable pour traiter les sujets âgés, pour interpréter les symptômes qu'ils peuvent présenter et pour définir l'expression et l'évolution particulière des pathologies. Le tissu cérébral supporte de nombreuses modifications de structure et de composition. Lorsque la perte endurée atteint un niveau critique, le vieillissement cérébral devient pathologique et les processus neurodégénératifs se développent de façon chronique et progressive. Selon les structures touchées, les troubles affectent la motricité, la sensibilité, le langage, la mémoire, la perception ou les capacités cognitives.

E. La maladie d'Alzheimer : une maladie neurodégénérative

Les maladies neurodégénératives se caractérisent par la destruction progressive d'une population ciblée et délimitée de cellules nerveuses. Cette mort neuronale est plus rapide que celle observée lors du vieillissement normal et intervient dans une région particulière du SNC. Il peut s'agir de structures profondes du cerveau comme pour la maladie de Parkinson ou de zones du cortex associées aux fonctions intellectuelles et émotionnelles comme pour la MA.

1. Mild Cognitive Impairment

Le vieillissement cognitif se caractérise par son hétérogénéité et sa variabilité individuelle sur le plan clinique. La plainte mnésique est très fréquente parmi les sujets âgés de la population générale et renvoie le plus souvent à un déficit cognitif léger, aussi appelé *Mild Cognitive Impairment* (MCI). Ce MCI désigne une baisse cognitive atypique de celle observée dans le vieillissement normal, mais ne représente pas cliniquement une démence. Cet état particulier est donc plutôt considéré comme une zone de transition entre le vieillissement normal et la démence et dont l'évolution conduit 5 fois plus souvent vers une MA (Petersen *et al.*, 1999 ; Nubukpo and Clement, 2004 ; Scheff *et al.*, 2006 ; Arendt, 2009 ; Sosa-Ortiz *et al.*, 2012). La prévalence de ce trouble cognitif léger se situe entre 3 et 4% chez les sujets âgés dans la population générale et pourrait atteindre 30 à 35% chez les personnes âgées placées en long séjour. La probabilité pour que l'état MCI évolue vers une démence varie de 25 à 80% selon l'âge des sujets (Nubukpo and Clement, 2004 ; Sosa-Ortiz *et al.*, 2012). Une étude de suivi de patients MCI durant 3 ans montre que jusque 40% d'entre eux vont réintégrer la population dite « normale » (Nubukpo and Clement, 2004). Lors de l'évolution de la MA, il existe inévitablement un stade « pré-Alzheimer » dit prodromique, durant lequel ce déclin cognitif léger est retrouvé. Des troubles dans l'intégrité synaptique ont d'ailleurs été détectés chez les personnes MCI, ce qui suggère que la dégénérescence synaptique soit initiée très en amont dans le processus de développement de la MA (Petersen *et al.*, 1999 ; Scheff *et al.*, 2006 ; Arendt, 2009). Identifier les patients MCI souffrant de ces pertes de mémoire bénignes susceptibles d'évoluer vers une démence revêt donc un intérêt tout particulier pour définir une prise en charge précoce permettant de retarder ou limiter les processus neurodégénératifs, et espérer ainsi éviter leur évolution vers un stade démentiel (Petersen *et al.*, 1999 ; Nubukpo and Clement, 2004).

2. Le cas de la maladie d'Alzheimer

C'est en 1906 que lors d'un congrès médical, le docteur Alois Alzheimer fait la description d'un trouble neuropsychiatrique particulier. Aujourd'hui connu sous le nom de MA. Il s'agit d'une maladie neurodégénérative, très majoritairement liée au vieillissement, et caractérisée par un syndrome démentiel. Considérée comme une démence amnésique, elle évolue de manière progressive et s'accompagne le plus souvent d'une altération croissante de la mémoire, de troubles des fonctions cognitives, de troubles du

comportement, d'une perte progressive du langage et d'une désorientation ayant un impact plus ou moins important sur les activités de la vie quotidienne des patients (Selkoe, 2001).

En raison de l'allongement de la durée de vie et de l'absence de traitements curatifs, ce syndrome est un problème majeur de santé publique dans les pays développés. Dans le monde en 2010, 35,6 millions de personnes étaient atteintes de démence et la MA en représentait 60 à 80% des cas (OMS, 2012b ; Sosa-Ortiz *et al.*, 2012). La prévalence de la MA augmente de manière exponentielle avec l'âge : elle touche environ 3% des personnes âgées entre 65 et 74 ans et s'élèverait à 50% pour les plus de 85 ans (Sosa-Ortiz *et al.*, 2012). En France, près de 900.000 personnes seraient touchées par une pathologie neurologique de type MA, avec près de 30.000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année parmi les 65 ans et plus. En 2015, le taux de prévalence pourrait atteindre 13% pour les hommes et 20% pour les femmes (Agence Régionale de Santé, 2012).

Les premières études des structures cérébrales de patients atteints par la MA menées par A. Alzheimer lui-même ont montré, grâce à une coloration à l'argent, la présence de lésions caractéristiques apparaissant comme des enchevêtrements neurofibrillaires à l'intérieur des cellules neuronales du cortex. Une coloration au rouge Congo a permis de mettre en évidence d'autres formations pathologiques, les plaques séniles, liées à une composante appelée peptide amyloïde. Ces plaques séniles sont formées de dépôts de fibrilles amyloïdes insolubles extracellulaires ainsi que d'agrégats intraneuronaux formés de paires de filaments hélicoïdaux (PHF) (Maccioni *et al.*, 2001 ; Selkoe, 2001 ; Haass and Selkoe, 2007). Il a fallu attendre le milieu des années 1980 pour découvrir que ces PHF, s'accumulant aussi bien dans les corps cellulaires que dans les prolongements cytoplasmiques, sont constitués principalement de microtubules associés à la protéine Tau hyperphosphorylée s'agrégant en hélice. L'hyperphosphorylation de Tau conduit à sa séquestration dans les PHF et cause la désorganisation des microtubules et des mécanismes de transport qu'ils doivent assurer, ce qui mène à la dégénérescence du neurone et à la mort cellulaire. À la même époque, il est rapporté que les dépôts amyloïdes sont, quant à eux, composés du peptide amyloïde β , ou A β , de 4 kDa et long de 40 à 42 acides aminés (Figure 11), présentant une structure particulière en feuillet β (Glennner and Wong, 1984 ; Maccioni *et al.*, 2001 ; Pastorino and Lu, 2006 ; Haass and Selkoe, 2007 ; Iqbal and Grundke-Iqbal, 2010 ; Ittner and Götz, 2011).

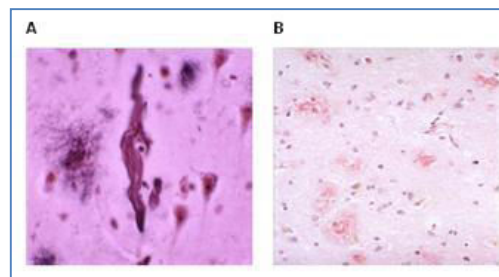


Figure 11 : Lésions histopathologiques cérébrales (cortex) caractéristiques de la MA

(d'après Castellani *et al.*, 2010)

(A) Dégénérescences neurofibrillaires marquées par une coloration à l'argent composées de paires de filaments hélicoïdaux (PHF) constitués principalement de microtubules associés à une protéine Tau hyperphosphorylée.
(B) Plaques séniles mises en évidence par une coloration au rouge Congo, composées de peptide amyloïde- β .

Si les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et les plaques amyloïdes sont des structures tout à fait différentes, elles sont toutes deux associées à la mort neuronale. Toutefois, les DNF ne sont pas caractéristiques de la MA, mais présentes dans d'autres maladies neurodégénératives appelées tauopathies. Les plaques amyloïdes quant à elles changent de manière progressive, d'un point de vue biochimique et morphologique, au cours du développement de la MA. Les premières lésions correspondent à des dépôts amorphes de peptide A β constituant des plaques diffuses. Ces lésions immatures évoluent au cours du temps vers des agrégats formés de dépôts plus compacts de peptide A β , de neurones dystrophiques et de cellules microgliales (Maccioni *et al.*, 2001 ; Selkoe, 2001 ; Pastorino and Lu, 2006 ; Arendt, 2009).

Les peptides, dénommés A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ selon leur longueur, dérivent de la protéolyse de leur précurseur, la protéine APP, sous l'action d'une série de protéases appelées α -, β - et γ -sécrétases (Maccioni *et al.*, 2001 ; Selkoe, 2001 ; Pastorino and Lu, 2006 ; Zhang *et al.*, 2011). Ils sont produits sous forme de monomères qui s'associent en oligomères neurotoxiques et synaptotoxiques dont l'interaction avec les membranes synaptiques initie la cascade de perturbations cellulaires conduisant aux dysfonctionnements synaptiques puis à la dégénérescence des neurones, en particulier dans l'hippocampe. Le peptide A β , sous forme oligomérique est donc un acteur majeur, au moins lors des stades précoces de la MA (Haass and Selkoe, 2007 ; Selkoe, 2008 ; Ballard *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2011).

L'âge est considéré comme le facteur de risque principal des formes sporadiques de MA représentant 99% des cas. Mais de nombreux autres facteurs de susceptibilité ont été décrits, comme le sexe, les facteurs sociaux (niveau d'éducation, activités physiques, stimulations intellectuelles, relations sociales, habitudes de vie, tabagisme, alcoolisme) ou les antécédents médicaux (Hartmann *et al.*, 2007 ; Ballard *et al.*, 2011 ; Sosa-Ortiz *et al.*, 2012). La plupart des sujets atteints de MA sont donc des sujets âgés soumis au vieillissement de l'organisme et du cerveau, et pouvant présenter une ou plusieurs autres pathologies associées susceptibles d'affecter les conditions de soin. Par exemple, 30% des personnes âgées de plus de 65 ans souffrant de MA ou d'autres démences, présentent aussi une maladie coronarienne, 22% une insuffisance cardiaque et 60% une hypertension. Dans 29% des cas, les patients sont également atteints de diabète, 26% d'arthrose, 17% d'une maladie rénale, 17% d'une maladie pulmonaire obstructive chronique et 16% d'une maladie affectant la thyroïde, tandis que 10% d'entre eux ont déjà eu un accident vasculaire cérébral et 9% un cancer (Alzheimer's Association, 2013). Cependant, si l'âge est le principal facteur de risque, il est aujourd'hui connu que la MA peut aussi toucher des sujets jeunes, avant l'âge de 60 ans. Les formes familiales causées par des mutations monogéniques de la préséniline-1, d'APP ou de Tau peuvent faire l'objet d'un diagnostic génétique et être étiquetées avec certitude. Les formes sporadiques chez ces patients dits jeunes sont par contre souvent diagnostiquées tardivement alors qu'ils nécessitent une prise en charge particulière, notamment en raison des difficultés inhérentes à l'activité professionnelle et à l'environnement familial comme des enfants à charge ou l'activité professionnelle du malade et/ou du

conjoint (Lebert *et al.*, 2012). Ces cas suggèrent que certains facteurs de risque indépendants de l'âge puissent favoriser le vieillissement pathologique du cerveau. Les liens de causes à effets sont difficilement établis mais le statut métabolique et plus précisément ses altérations, reliées en partie au processus de vieillissement de l'organisme, sont des paramètres largement décrits comme étant impliqués dans le développement de la MA (Selkoe, 2001 ; Fewlass *et al.*, 2004 ; Hartmann *et al.*, 2007 ; Ballard *et al.*, 2011 ; Houtkooper *et al.*, 2011 ; Sosa-Ortiz *et al.*, 2012 ; Alzheimer's Association, 2013).

F. Vieillessement et maladies métaboliques

1. Effets du vieillissement sur la composition corporelle

L'organisme est constitué macroscopiquement d'éléments de densité et de nature différentes (graisse, eau, protéines, os, etc.), dont les quantités sont maintenues dans des proportions étroites chez l'homme en conditions physiologiques. La composition corporelle d'une personne constitue un état dynamique évoluant au cours de la vie et qui est représentatif de la qualité du vieillissement (Tableau III) (Buffa *et al.*, 2011).

Tableau III : Masse corporelle et sa composition au cours du vieillissement chez l'homme

(d'après Forbes and Reina, 1970)

	Âge (ans)	Échantillon	Masse corporelle (kg)	Masse maigre (kg)	Masse maigre (%)	Masse grasse (kg)	Masse grasse (%)
Femme	25	267	59	40	68	19	32
	45	391	67	39	58	28	42
	55	373	70	39	56	31	44
	65 - 70	144	69	35	51	34	49
Homme	25	585	73	59	81	14	19
	45	881	76	56	74	20	26
	55	835	74	52	70	22	30
	65 - 70	234	73	47	64	26	36

Au cours du vieillissement, la composition corporelle est modifiée aussi bien au niveau de la masse grasse que de la masse maigre, chez les femmes comme chez les hommes.

Classiquement, la composition corporelle est divisée en deux types de compartiments, la masse maigre représentée surtout par les protéines et la masse grasse que composent les lipides. La masse corporelle représente l'ensemble de ces deux compartiments et est fortement corrélée à la mesure de la masse grasse que ce soit chez le jeune adulte ou le sujet âgé. L'indice de masse corporelle (IMC), correspondant au rapport du poids sur la taille élevée au carré et exprimée en kg/m^2 , est utilisé pour évaluer la corpulence idéale, l'insuffisance pondérale ou l'obésité. Les valeurs normales de l'IMC d'une femme ou d'un homme adulte sont respectivement de 20 à 25 kg/m^2 ou de 24 à 29 kg/m^2 chez le sujet âgé en bonne santé (Beck and Ovesen, 1998, 2002). Selon les travaux de Beck et Ovesen, une perte de poids et un IMC inférieur à 24 doivent être considérés comme des marqueurs d'alerte pouvant signaler une dénutrition.

notamment chez la personne âgée. Le poids diminue au cours du vieillissement après un maximum pondéral entre 40 et 50 ans chez l'homme et entre 50 et 60 ans chez la femme. Le poids se stabilise ensuite, puis décroît progressivement à partir de 70 ans. La perte pondérale est estimée à 1 kg par décennie chez le sujet âgé en bonne santé, alors qu'une perte de poids plus importante pourrait être un marqueur de fragilité. L'âge de 70 ans serait alors un seuil à partir duquel surviennent des modifications qualitatives et quantitatives de la composition corporelle (Beck and Ovesen, 1998, 2002).

2. Le métabolisme glucidique et le diabète de type 2

La tolérance à une charge en glucose est réduite chez les personnes âgées et des études rapportent qu'une glycémie à jeun plus élevée que la normale est particulièrement fréquente chez la personne de plus de 60 ans. En effet, le taux de glucose augmente chez l'homme avec l'âge aussi bien à jeun, de 1 à 2 mg/dL par décennie, qu'après une hyperglycémie provoquée par voie orale, de 6 à 9 mg/dL par décennie (Chang and Halter, 2003 ; Basu *et al.*, 2006). L'hyperglycémie est fortement associée à la survenue d'une résistance à l'insuline et à de possibles modifications de sa clairance, ce qui à terme provoque une diminution de sa sécrétion par épuisement des réserves chez les personnes âgées (Chang and Halter, 2003 ; Scheen, 2005 ; Basu *et al.*, 2006). Il a également été remarqué qu'en plus de l'âge, le genre intervient dans ce phénomène puisque des différences plus ou moins marquées selon les paramètres étudiés ont été mises en évidence entre les hommes et les femmes (Figure 12) (Basu *et al.*, 2006). Plusieurs autres facteurs peuvent également être impliqués, comme l'alimentation, l'activité physique, la prise de médicaments, les maladies préexistantes et l'augmentation de l'adiposité (Chang and Halter, 2003 ; Scheen, 2003).

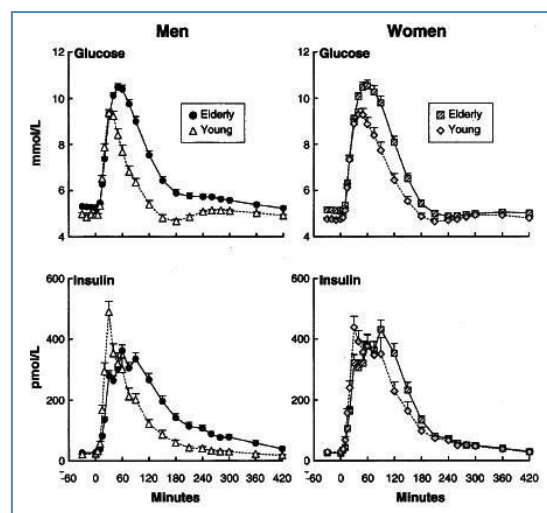


Figure 12 : Glycémie et insulinémie au cours du vieillissement chez l'homme

(d'après Basu *et al.*, 2006)

Suivi des concentrations plasmatiques en glucose (en mmol/L) et en insuline (en pmol/L) chez l'homme (à gauche) et chez la femme (à droite) dans des populations jeunes (young, 28 ans) et âgées (elderly, 70 ans) avant et après l'ingestion d'un repas contenant du glucose au temps 0. Ces deux paramètres sont affectés par le vieillissement, une augmentation des glycémies à jeun et postprandiale, ainsi qu'une diminution de la sécrétion d'insuline postprandiale sont observées chez les personnes âgées des deux sexes. Le genre joue également un rôle sur la sécrétion d'insuline puisque la réponse entre hommes et femmes est légèrement modifiée.

Dans un premier temps, un défaut de réponse des récepteurs insuliniques se traduisant par une augmentation de sa sécrétion survient jusqu'à épuisement des réserves. Les premiers défauts de sécrétion de l'insuline dans la progression de l'intolérance au glucose peuvent être subtils, justifiant la mesure de la fonctionnalité des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. La sensibilité de ces cellules peut diminuer avec l'âge, ce qui affaiblit leurs fonctions et les capacités de la réponse insulinique (Chang and Halter, 2003 ; Scheen, 2005 ; Szoke *et al.*, 2008). Au cours du vieillissement, les cellules β sont altérées par la diminution de leur nombre, l'accumulation de lipofuscine et la réduction de l'expression de protéines associées à la régénération cellulaire (Cnop *et al.*, 2011). À terme, ceci entraîne une altération de la sécrétion pulsatile d'insuline, une diminution de la sensibilité des cellules β aux hormones stimulant la sécrétion d'insuline et inhibant la sécrétion de glucagon (Chang and Halter, 2003 ; Scheen, 2005). Ces perturbations engendrent une résistance progressive à l'insuline, responsable d'une réduction de la captation du glucose et d'une hyperglycémie chez les sujets âgés. Ces derniers présentent alors une grande intolérance au glucose et une insulino-résistance et nombre d'entre eux développent un diabète de type 2 (Scheen, 2003).

Le diabète de type 2 est un syndrome hétérogène caractérisé par des anomalies du métabolisme glucidique. Les causes sont multifactorielles et comprennent à la fois des éléments génétiques et environnementaux qui affectent la fonction des cellules β des îlots de Langerhans dans divers tissus (muscles, foie, tissu adipeux, pancréas) (Scheen, 2003, 2005). Des études démographiques dans 91 pays ont estimé que la prévalence du diabète dans le monde chez les adultes de 20 à 79 ans était de 6,4% (285 millions) en 2010 et sera de 7,7% (439 millions) d'ici 2030. Entre 2010 et 2030, le nombre d'adultes atteints de diabète augmentera de 69% dans les pays en cours de développement et de 20% dans les pays développés (Shaw *et al.*, 2010). Le diabète est l'une des maladies chroniques les plus répandues dans presque tous les pays et sa prévalence augmente avec l'âge (Figure 13) (Chang and Halter, 2003 ; Shaw *et al.*, 2010).

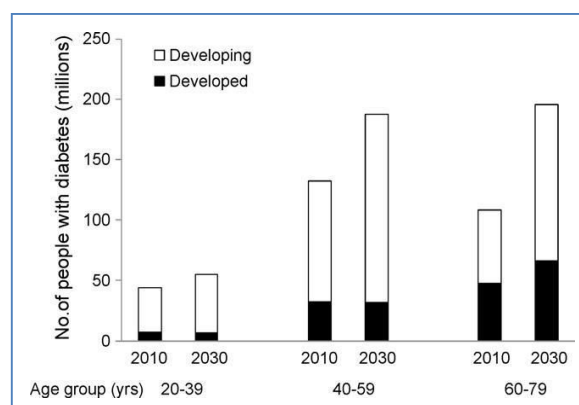


Figure 13 : Adultes souffrant de diabète en 2010 et estimation pour 2030 en fonction de l'âge

(d'après Shaw *et al.*, 2010)

Le nombre de personnes souffrant de diabète est exprimé en millions dans les pays développés (developed, en noir) et en voie de développement (developing, en blanc) recensé en 2010 et estimé pour 2030 dans trois tranches d'âge, les 20 à 39 ans, les 40 à 59 ans et les 60 à 79 ans.

Des études épidémiologiques suggèrent que les anomalies du métabolisme de l'insuline chez les diabétiques influencent mécaniquement l'apparition de la MA et sont associées à un risque 2 à 3 fois supérieur de développer la pathologie (Cao *et al.*, 2007 ; Pasinetti and Eberstein, 2008). Au cours de ces dernières années, certains ont considéré la MA comme un trouble neuroendocrinien et l'ont même parfois appelé « diabète de type 3 ». Les données démontrent effectivement qu'une signalisation insulinaire altérée peut être impliquée dans la pathogenèse de la MA. Le diabète et la MA présentent en commun par exemple des signes de stress oxydant, comme les AGE, et les patients diabétiques auraient un risque plus prononcé de survenue de MA car les AGE s'accumuleraient dans les enchevêtrements neurofibrillaires et les plaques amyloïdes du cerveau (Kroner, 2009). Une association entre diabète et troubles mnésiques a été trouvée chez des sujets âgés (Luchsinger *et al.*, 2007). Si les mécanismes par lesquels le diabète de type 2 peut avoir un impact sur le risque de MA ne sont pas bien compris, plusieurs éléments indiquent cependant que l'insuline et les anomalies métaboliques liées au diabète peuvent affecter la génération et la dégradation du peptide A β . En effet, la résistance à l'insuline favorise la voie amyloïdogène et la production du peptide A β_{1-40} et A β_{1-42} dans le cerveau par une augmentation des activités β - et γ -sécrétases (Ho *et al.*, 2004 ; Cao *et al.*, 2007) et par une diminution de leur dégradation par l'enzyme IDE de dégradation de l'insuline (Ho *et al.*, 2004 ; van der Heide *et al.*, 2006 ; Pasinetti and Eberstein, 2008). Une diminution de l'expression de cette enzyme a par ailleurs déjà été notée dans l'hippocampe de sujets atteints de MA, en particulier chez les sujets exprimant l'apolipoprotéine E4, un facteur génétique de susceptibilité connu de la MA (Cook *et al.*, 2003). Dans des conditions diabétiques, des déficiences de certaines voies de signalisation cellulaires sensibles à l'insuline (PI3K, AKT/PKB), une diminution de l'expression des récepteurs insulinaires dans le cerveau et un défaut de transport de l'insuline à travers la BHE peuvent aussi mécaniquement favoriser la neuropathologie liée à la MA et les altérations cognitives (Ho *et al.*, 2004 ; Pasinetti and Eberstein, 2008 ; Bosco *et al.*, 2011 ; Zemva and Schubert, 2014).

3. Le métabolisme lipidique, l'obésité et les dyslipidémies

Le métabolisme des lipides aussi est fortement altéré avec l'âge, avec un impact clairement défini sur de nombreuses maladies liées au vieillissement, en particulier métaboliques, cardio-vasculaires et neurodégénératives. La masse grasse correspond à la graisse amorphe du tissu adipeux (constitué à 80% de graisses) qui se retrouve sous différentes formes dans l'organisme : les dépôts intermusculaires métaboliquement très actifs, les dépôts profonds ou intra-abdominaux métaboliquement actifs (péri-rénal, mésentérique) et les dépôts superficiels ou sous-cutanés (abdominal, fémoral) (Beaufrère and Morio, 2000 ; Zamboni *et al.*, 2013). La masse grasse de l'organisme augmente lentement au cours de la vie jusqu'à 65 à 70 ans pour atteindre en moyenne 35% du poids corporel chez l'homme et 49% chez la femme (Tableau III). Généralement, la masse grasse s'infléchit après 80 ans (Forbes and Reina, 1970). L'âge est également associé à une redistribution du tissu adipeux indépendamment des changements de poids corporel, avec une augmentation du volume de tissu adipeux intra-abdominal et une diminution du tissu adipeux sous-

cutané (Buffa *et al.*, 2011 ; Zamboni *et al.*, 2013). La distribution des dépôts est différente selon les genres. L'accumulation est principalement abdominale chez l'homme (profil androïde) et glutéal (muscle fessier) et fémoral (profil gynoïde) chez la femme (Zamboni *et al.*, 2013). La quantité du tissu adipeux intra-abdominal est augmentée de plus de 60% chez les sujets âgés de plus de 60 ans des deux sexes, par rapport à des témoins jeunes de 20 à 30 ans. La relocalisation s'accompagne de modifications régionales de la masse grasse, ce qui augmente le risque cardiovasculaire ou de syndromes métaboliques (diabète, obésité) (Buffa *et al.*, 2011). La dérégulation du métabolisme des lipides pourrait en partie expliquer non seulement l'augmentation d'adiposité viscérale, mais aussi la présence de dépôts de graisse dans les tissus non adipeux comme les muscles squelettiques et cardiaques, le foie et le pancréas (Zamboni *et al.*, 2013).

Chez les hommes comme chez les femmes, les niveaux de lipides plasmatiques sont modifiés de façon assez semblable au cours du vieillissement, avec un léger décalage dans l'âge. Ainsi, la cholestérolémie et la triglycéridémie augmentent jusqu'à l'âge de 50 ans chez les hommes et 60 ans chez les femmes pour se stabiliser de manière plus ou moins durable. La triglycéridémie après 70 ans connaît une phase de diminution. Les niveaux de cholestérol associé aux LDL subissent des changements identiques à ceux du cholestérol total, avec là encore une phase de plateau plus précoce chez l'homme, vers 50-60 ans, que chez les femmes vers 60-70 ans. Concernant les niveaux de cholestérol associé aux lipoprotéines de haute densité (HDL), ils diminuent légèrement jusqu'à l'âge de 50 ans pour finalement se stabiliser chez l'homme, tandis que cette diminution se poursuit tout au long de la vie des femmes (Ferrara *et al.*, 1997 ; Kuzuya *et al.*, 2002). Une étude récente sur des rongeurs décrit les mêmes changements métaboliques que chez l'homme (augmentation du poids corporel et de la masse grasse), ainsi qu'une atteinte du métabolisme des AG. Cette altération se reflète par une diminution de l'expression de gènes impliqués dans l'oxydation des AG dans le muscle, le foie et le tissu adipeux et s'accompagne d'une augmentation des concentrations plasmatiques d'AG libres totaux, et des acides stéarique (C18:0) et palmitique (C16:0) entre autres, ce qui pourrait résulter de perturbations du transport, de la captation ou du stockage des AG (Figure 14) (Houtkooper *et al.*, 2011). L'augmentation des apports en AG libres vers les organes, en particulier si elle est combinée à une β -oxydation déficiente, peut conduire à un stockage des triglycérides (TG) et contribuer à une lipotoxicité et à un dysfonctionnement systémique (Zamboni *et al.*, 2013). Chez le sujet âgé, la prise de poids, la redistribution des graisses et l'augmentation des lipides plasmatiques représentent des risques pour la santé et peuvent mener à des conséquences cliniques importantes comme l'obésité ou des complications cardiovasculaires comme les cardiopathies ischémiques, les maladies vasculaires périphériques ou une insuffisance cardiaque (OMS, 2013b ; Zamboni *et al.*, 2013).

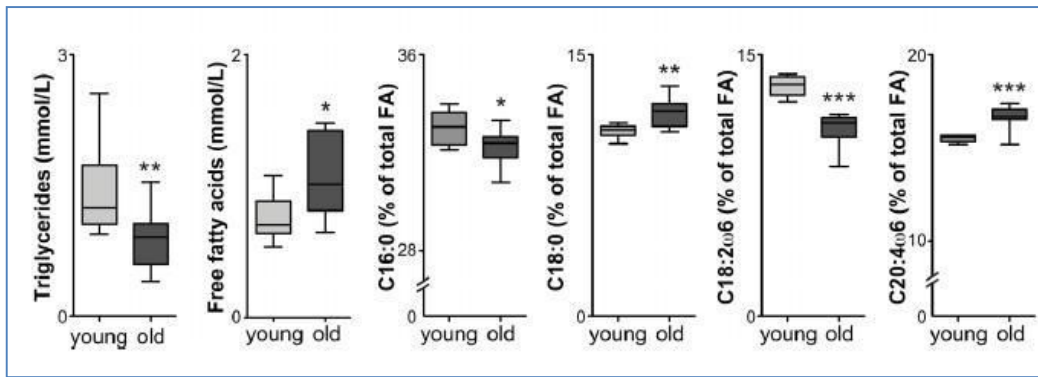


Figure 14 : Concentrations plasmatiques en triglycérides et en acides gras au cours du vieillissement chez le rat

(d'après Houtkooper *et al.*, 2011)

Les concentrations plasmatiques des lipides sélectionnés, triglycérides et acides gras libres (free fatty acids), sont exprimées en mmol/L, tandis que les taux d'acide palmitique (C16:0), d'acide stéarique (C18:0), d'acide linoléique (C18:2ω6) et d'acide arachidonique (C20:4ω6) sont calculés par rapport aux acides gras totaux (% of total FA). La représentation compare les valeurs mesurées au sein des groupes de souris jeunes (young, 3 mois) et âgées (old, 22 mois). Le vieillissement altère significativement tous ces paramètres.

L'OMS définit le surpoids ou l'obésité comme une accumulation anormale ou excessive de graisses associée à un risque pour la santé. Pour les adultes, la mesure de l'obésité la plus communément utilisée est l'IMC. L'OMS délimite l'obésité par un IMC égal ou supérieur à 30 kg/m². Il s'applique aux deux sexes et à toutes les tranches d'âge adulte. Il doit donc être considéré comme une indication approximative, car il ne correspond pas nécessairement au même pourcentage de masse grasseuse selon les individus (OMS, 2013a). C'est pourquoi, la mesure du tour de taille semble être plus pertinente pour déterminer une obésité abdominale, la limite étant fixée à 102 cm pour les hommes et 88 cm pour les femmes (Després and Lemieux, 2006 ; Buffa *et al.*, 2011). À l'échelle mondiale, le nombre de cas d'obésité a doublé depuis 1980 (OMS, 2013a). La prévalence du surpoids et de l'obésité augmente avec l'âge. Aux États-Unis, la prévalence autour des années 2000 était de 42,5% chez les femmes de 60 à 69 ans, avec une augmentation de 12,7% par rapport à la période 1988-1994, 31,9% chez celles de 70 à 79 ans et de 19,5% chez celles de plus de 80 ans. La prévalence de l'obésité était de 38,1% chez les hommes de 60 à 69 ans, avec une augmentation de 13,3%, 28,9% chez ceux âgés de 70 à 79 et de 9,6% chez ceux âgés de plus de 80 ans. La prévalence de l'obésité chez les personnes âgées en Europe semble être inférieure à celles des États-Unis. Au Royaume-Uni par exemple, près de 30% des femmes et 28% des hommes âgés de 55 à 65 ans sont obèses, 25% des femmes et 18% des hommes âgés de 65 à 75 ans et 22% des femmes et 12% des hommes âgés de 75 ans ou plus (Zamboni *et al.*, 2005). En France, la prévalence de l'obésité chez les 65 ans et plus serait passée de 11,2% en 1997 à 18,7% en 2012 (Figure 15) (ObEpi, 2012).

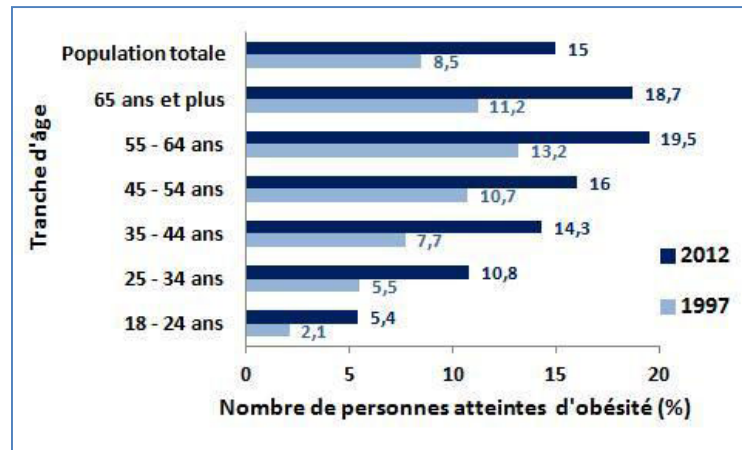


Figure 15 : Évolution de la prévalence de l'obésité en France entre 1997 et 2012

(d'après ObEpi, 2012)

La prévalence de l'obésité augmente au cours du vieillissement et continue de progresser avec le temps. Si 13,2% des personnes de 55 à 64 ans étaient affectées en 1997, ce chiffre atteint 19,5% en 2012. La tranche d'âge la plus touchée par la progression est celle des 65 ans et plus qui passe de 11,2% à 18,7%.

Une grande attention s'est portée sur l'obésité en tant que facteur de risque pour la MA. En effet, de plus en plus de preuves suggèrent qu'il existe une association entre une obésité juvénile ou à l'âge adulte et le risque de démence en fin de vie (Pasinetti and Eberstein, 2008 ; Ballard *et al.*, 2011 ; Maesako *et al.*, 2012). Une étude sur l'obésité à l'âge adulte a par exemple montré que des participants obèses (IMC supérieur ou égal à 30) avaient un risque de démence supérieur de 35% à celui de sujets de poids normal (IMC de 18,6 à 24,9) (Whitmer, 2007). En accord avec ce constat, il avait précédemment été montré une association entre les niveaux plasmatiques de peptide A β , l'IMC et la masse grasse (Balakrishnan *et al.*, 2005). Cependant, l'impact de l'obésité en fin de vie reste controversé (Cao *et al.*, 2007 ; Boitard *et al.*, 2014 ; Knight *et al.*, 2014). Si une étude réalisée sur des participantes âgées de 70 à 88 ans a montré que le risque de développer une MA à partir de 70 ans croît de 36% quand l'IMC augmente de 1 kg/m² (Gustafson *et al.*, 2003), d'autres analyses rapportent qu'au contraire, le risque de démence est accru chez les personnes ayant un IMC faible ou ayant subi une perte de poids importante avant le diagnostic (Johnson *et al.*, 2006 ; Luchsinger *et al.*, 2007 ; Atti *et al.*, 2008). La relation entre obésité et MA semble donc dépendre de l'âge d'apparition de l'obésité et de la perte de poids qui a précédé la maladie (Cao *et al.*, 2007 ; Boitard *et al.*, 2014 ; Knight *et al.*, 2014). Ces divergences pourraient être liées à la nature complexe de la MA, dont la physiopathologie débute probablement des dizaines d'années avant l'apparition de signes cliniques. Ainsi, les personnes atteintes de démences présentent un IMC inférieur à celles non atteintes, le taux de déclin de l'IMC étant plus élevé et plus rapide durant les années précédant l'apparition de la maladie. En revanche, un IMC élevé à l'âge adulte, mesuré avant l'apparition de symptômes, peut accélérer l'apparition de la MA par l'intermédiaire de troubles vasculaires ou par l'effet délétère de la sécrétion par le tissu adipeux de composés hormonaux à l'origine d'une (neuro)-inflammation chronique (Gustafson, 2006).

Dans la forme commune de l'obésité, le stockage des lipides pourrait être favorisé par la résistance à la leptine résultant d'une baisse de la disponibilité de la leptine dans l'hypothalamus, une altération de

l'action de la leptine périphérique, ou l'association des deux phénomènes lors du vieillissement. La leptine est une hormone majoritairement sécrétée par les tissus adipeux et circulant dans le plasma, qui régule les réserves de graisses de l'organisme et la prise alimentaire en contrôlant la sensation de satiété (Zamboni *et al.*, 2013). Il est clairement établi que les dérivés de cette hormone jouent un rôle fondamental dans la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel par l'intermédiaire de leurs récepteurs exprimés dans les noyaux hypothalamiques. Ces récepteurs sont par ailleurs largement exprimés dans de nombreuses régions du cerveau comme le cortex, l'hippocampe, le tronc cérébral et le cervelet suggérant que la leptine puisse jouer d'autre rôle au niveau central. De nombreuses études font aujourd'hui le lien entre l'obésité et l'hyperleptinémie périphérique, la diminution du transport de la leptine à travers la BHE et l'altération de la signalisation initiée par la stimulation de ses récepteurs (Harvey, 2007 ; Tang, 2008 ; Morrison, 2009). Plusieurs études ont mis en évidence qu'une dérégulation et/ou une insuffisance en leptine, fréquemment trouvées chez les patients obèses, étaient liées aux déficits cognitifs associés aux maladies neurodégénératives. En effet, les niveaux plasmatiques de leptine sont plus faibles chez les patients Alzheimer (Harvey, 2007 ; Greco *et al.*, 2008). Des études ont montré que la leptine est capable de réguler les différents acteurs de la cascade amyloïde, notamment en diminuant le clivage de la protéine APP par la β -sécrétase neuronale, par un mécanisme qui pourrait impliquer des modifications de la composition lipidique membranaire (Greco *et al.*, 2008 ; Morrison, 2009). Compte tenu des voies de signalisation activées par la leptine, favorisant la survie et la croissance cellulaire (STAT3, PI3K, ERK1/2), il n'est pas surprenant de lui trouver un rôle neurotrophique et anti-apoptotique dans le SNC (Tang, 2008 ; Morrison, 2009). De plus, l'administration de leptine diminue la concentration du peptide A β et la phosphorylation de la protéine Tau dans le cerveau de souris transgéniques modèle de MA tout en améliorant les capacités d'apprentissage et les performances mnésiques de ces animaux (Fewlass *et al.*, 2004 ; Harvey, 2007 ; Greco *et al.*, 2009 ; Morrison, 2009).

Les anomalies métaboliques associées à l'obésité intra-abdominale incluent aussi des composants du métabolisme des lipoprotéines, comme le transport plasmatique du cholestérol et des TG. Ainsi, l'obésité est souvent accompagnée d'une dyslipidémie. Les anomalies caractéristiques de l'obésité intra-abdominale sont une hypertriglycéridémie et une concentration plasmatique en HDL-cholestérol réduite, ces mêmes anomalies étant observées aussi chez les individus âgés (Kuzuya *et al.*, 2002). Par ailleurs, de nombreuses études portent une attention considérable sur la possible association entre le risque de MA et le métabolisme du cholestérol dans le SNC cette fois. L'hypercholestérolémie a été proposée comme facteur de risque de la pathologie amyloïde (Sponne *et al.*, 2004 ; Hartmann *et al.*, 2007 ; Cossec *et al.*, 2010 ; Ballard *et al.*, 2011). Un taux de cholestérol plus élevé que chez les sujets sains a été détecté dans le cerveau de patients atteints de MA et plus particulièrement autour des plaques séniles et au niveau des neurones dystrophiques. Cette accumulation pourrait entraîner une production accrue de peptide A β due à une activité augmentée des β - et γ -sécrétases (Xiong *et al.*, 2008). De plus, des études ont montré que le traitement *in vitro* par les statines, des inhibiteurs de la synthèse de cholestérol, réduisait fortement les

taux d'A β_{1-40} et A β_{1-42} intracellulaires et sécrétés (Burns and Duff, 2002 ; Hartmann *et al.*, 2007 ; Cossec *et al.*, 2010 ; Ballard *et al.*, 2011) et chez l'homme, des études épidémiologiques ont montré une diminution de 60 à 73% de l'incidence de la MA chez les patients atteints de troubles cardiovasculaires traités par statines (Jick *et al.*, 2000 ; Wolozin *et al.*, 2000). Enfin, un facteur majeur de risque de MA reconnu est le gène codant pour l'apolipoprotéine E. Cette protéine intervient dans le métabolisme, le transport et la distribution du cholestérol. De nombreuses études ont montré une association entre l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E et la MA. En effet, il semblerait que la fréquence de cet allèle augmente chez les patients atteints de MA, aussi bien de formes familiales que de formes sporadiques. De façon intéressante, l'apoE4 est aussi un facteur de risque génétique majeur de l'hypercholestérolémie et du risque cardio-vasculaire, ce qui lie la MA au statut lipidique et aux autres maladies liées au vieillissement (Drouet *et al.*, 2000 ; Selkoe, 2001 ; Florent-Bécharde *et al.*, 2007 ; Gralle and Ferreira, 2007 ; Hooijmans *et al.*, 2009). Toutefois, malgré l'ensemble de ces données, les études épidémiologiques examinant le lien entre MA et les dyslipidémies restent encore complexes et parfois contradictoires.

En résumé de cette première partie, l'allongement de la durée de vie est un phénomène persistant, au moins en Europe et dans les pays en développement. Pourtant, le recul de l'espérance de vie sans incapacité traduit une incidence accrue des maladies liées au vieillissement portant rapidement atteinte à l'autonomie des personnes âgées. En effet, le vieillissement est initié sur la base de facteurs génétiques et environnementaux qui influent dès la naissance sur l'état physiologique d'un individu. Il induit plusieurs phénomènes biologiques tels que la réduction du nombre de cellules, la détérioration de protéines tissulaires, l'atrophie des tissus et un ralentissement ou des anomalies du métabolisme. Ces variations d'organisation et de composition corporelle accentuent le risque de déséquilibre pouvant conduire une situation délétère. Ainsi, l'exposition à des facteurs de risque comme l'hypertension, le stress, l'hyperlipidémie, l'obésité ou l'alimentation constituent des déclencheurs communs pour de multiples pathologies, et sont autant d'effecteurs capables de favoriser un vieillissement pathologique. Les stratégies avancées depuis des années par la médecine, la recherche et le ministère de la santé portent principalement sur l'aspect curatif au détriment de la prévention, avec souvent des traitements lourds pour les personnes âgées aussi bien en termes de coûts économique et sociétal que d'inconfort. La préservation de la santé des seniors est de plus en plus présentée comme un investissement social et économique afin de prévenir le vieillissement pathologique, les maladies chroniques associées et le risque de dépendance que de favoriser l'allongement de la durée de vie. Depuis quelques années, cette prévention prend de l'ampleur avec des campagnes de promotion sur les habitudes de vie et la mise en place de programmes visant à promouvoir un vieillissement actif et sain (« Active ageing » en 2002, « Healthy ageing » de 2004 à 2007 et « Vieillir en bonne santé »). L'âge est un facteur de risque non modifiable du vieillissement pathologique, certes, mais ses effets peuvent être modulés par plusieurs facteurs environnementaux (facteurs socio-économiques, habitudes de vie, activité physique et alimentation) capables de retarder ou

au contraire d'accélérer les processus délétères liés au vieillissement. Dans ce contexte, la prévention par la nutrition nous semble particulièrement intéressante, de nombreuses études ayant montré que les perturbations du métabolisme, notamment lipidique, sont des facteurs de risque, alors que certains lipides alimentaires, comme les AGPI *n-3*, peuvent non seulement corriger les dyslipidémies, mais aussi préserver les fonctions cognitives pour lutter contre le vieillissement cérébral.

II. La nutrition, une approche préventive du vieillissement cérébral

L'amélioration de la qualité nutritionnelle des régimes alimentaires constitue, en ce début de 21^{ème} siècle, un enjeu majeur pour les politiques de santé publique menées en France, en Europe et dans le monde. Une nutrition de qualité est désormais considérée comme un facteur de protection de la santé dans nos sociétés occidentales. Les avancées de la recherche ont, entre autres, précisé le rôle que jouent l'inadéquation des apports nutritionnels et l'insuffisance d'activité physique dans le déterminisme de nombreuses maladies chroniques et/ou liées au vieillissement. Depuis 2001, un Programme National Nutrition Santé s'est mis en place en France. Les objectifs de ce plan pour les années 2011 à 2015 sont les suivants : réduire l'obésité et le surpoids dans la population, augmenter l'activité physique et diminuer la sédentarité à tous les âges, améliorer les pratiques alimentaires et les apports nutritionnels, notamment chez les populations à risque, et enfin réduire la prévalence des pathologies nutritionnelles (Ministère des Affaires sociales et de la Santé, 2011).

A. La nutrition et le vieillissement cérébral

1. *Les apports nutritionnels conseillés*

La situation sanitaire de tout individu est en partie conditionnée par la qualité nutritionnelle des apports alimentaires, et bien sûr les personnes âgées n'échappent pas à cette règle. La malnutrition de type protéo-énergétique touche 30 à 50% des seniors en institution, ce qui diminue considérablement leurs activités physiques et psychiques et accroît le risque de morbidité et de mortalité. Cette malnutrition est souvent préalable à l'entrée en institution, ce qui signifie une inadéquation de l'alimentation aux besoins de la plupart des personnes âgées qui peuvent montrer un désintérêt pour les repas pour diverses raisons (isolement, problèmes de mastication ou de digestion, par exemple). Ceci peut se traduire par des carences, notamment en protéines et en micronutriments (minéraux, vitamines), qui peuvent s'avérer lourdes de conséquences et accroître le risque de pathologies liées au vieillissement. S'il est parfaitement admis que l'alimentation doit être adaptée aux besoins de chaque individu, certaines idées reçues doivent être rejetées et il faut bien comprendre que les personnes âgées ont des besoins nutritionnels équivalents, voire supérieurs, à ceux d'un jeune adulte (Payette *et al.*, 1995 ; Ferry *et al.*, 2001 ; Denizart *et al.*, 2004 ; Elmadfa and Meyer, 2008). Une alimentation équilibrée et adaptée se définit par une alimentation conforme, en quantité comme en qualité, aux besoins liés à la dépense énergétique. Afin de répondre aux besoins nutritionnels de 97 à 98% de la population, les apports journaliers recommandés (AJR) en macro- ou micronutriments sont sciemment surestimés de deux écarts-types au-dessus de l'exigence moyenne estimée dans la population (Skully, 2014).

Au cours du vieillissement des individus, les besoins en macronutriments n'évoluent que très peu. Contrairement aux glucides et aux lipides, les protéines ne sont pas stockées sous forme de réserve

mobilisable dans l'organisme et lorsque les apports extérieurs diminuent, le corps synthétise des protéines au détriment de certains tissus, essentiellement le tissu musculaire. Les besoins en protéines sont d'environ 0,8 g/kg/j chez l'adulte et peuvent être augmentés jusqu'à 1 à 1,2 g/kg/j chez les personnes âgées de plus de 70 ans pour compenser ou prévenir la fonte musculaire. Quant aux besoins en glucides et lipides, ils ne sont pas modifiés lors du vieillissement et doivent représenter respectivement moins de 50% et de 30% de l'apport énergétique (Ferry *et al.*, 2001 ; Selzner, 2006 ; de Abreu *et al.*, 2014 ; Skully, 2014). Une étude suisse a montré que, sur une cohorte de 9.320 participants âgés de 35 à 75 ans, la plupart des recommandations alimentaires en Suisse et plus généralement en Europe ne sont suivies que par moins de 30% des hommes et de 40% des femmes, sans aucune amélioration lors des dernières années. Les lipides sont particulièrement concernés par ce phénomène et notamment les acides gras saturés (AGS) et les AGPI, comme le montre le **tableau IV** (de Abreu *et al.*, 2014).

Tableau IV : Suivi des recommandations alimentaires de la population suisse en 2009

(d'après de Abreu *et al.*, 2014)

Nutriments	Recommandations	Suivi des hommes (%)	Suivi des femmes (%)
Glucides	> 50%	29,3	36,2
Protéines	< 20%	91,9	91,1
Lipides	< 30%	28,4	25,8
AGS	< 10%	21,6	24,8
AG monoinsaturés	> 10%	85,5	89,3
AGPI	> 10%	1,1	1,2
Cholestérol	< 300mg/j	43,6	61,4

Les recommandations sont exprimées en % ou unités de l'apport énergétique journalier.

Les besoins quantitatifs en micronutriments et surtout en vitamines, ainsi que les conséquences de leurs carences sur la santé, ont été largement étudiés chez les personnes âgées. Le **tableau V** récapitule les AJR de quelques minéraux et vitamines chez les personnes âgées dont un déficit peut entraîner un risque pour le SNC.

Tableau V : Risques pour le SNC associés à un déficit en minéraux et vitamines chez les personnes âgées

(d'après Selzner, 2006 ; Bergman *et al.*, 2009 ; Skully, 2014)

Minéraux / Vitamines	AJR	Principal rôle dans l'organisme	Risques associés à une carence pour le SNC
Chrome	125 µg/j	Métabolismes glucidique et lipidique	Hyperglycémie, signes nerveux
Vitamine E	20 à 50 mg/j	Antioxydant	Syndrome neurodégénératif
Vitamine B6	2,2 mg/j	Métabolisme des acides aminés	Déclin cognitif
Vitamine B9	400 µg/j	Métabolisme des acides aminés	Dépression, troubles mnésiques, anémie
Vitamine B12	3 µg/j	Transfert de groupes méthyl	Manifestations neurologiques, déclin cognitif

Dans les sociétés occidentales, où les denrées alimentaires sont d'une grande variété et très accessibles, l'attention portée au choix et à l'équilibre du régime alimentaire doit prendre en compte les deux faces de la même pièce. L'alimentation peut être vue comme la source de nombreux nutriments qui peuvent contribuer à préserver le bon fonctionnement de l'organisme et celui du cerveau en particulier, à ralentir le vieillissement, normal comme pathologique, et à lutter contre ses conséquences délétères. En effet, plusieurs études ont examiné les effets de divers nutriments sur les performances mnésiques et le déclin cognitif, dans l'objectif d'optimiser, tant d'un point de vue quantitatif que qualitatif, les apports nutritionnels qui favoriseraient un vieillissement réussi. Mais l'alimentation peut aussi être considérée comme une source de déséquilibres et d'apport d'éléments qui peuvent s'avérer néfastes et promouvoir le vieillissement, éléments dont il convient évidemment de limiter la consommation. Diverses stratégies nutritionnelles préventives ont été présentées ces dernières décennies, visant principalement à limiter les régimes riches en graisses ou en calories, ou au contraire à enrichir l'alimentation, tant sur le plan qualitatif que quantitatif, avec des apports en antioxydants ou en AGPI.

2. Les régimes riches en graisses saturées, en sucres et en cholestérol

Les régimes riches en lipides saturés, en sucres ou en cholestérol induisent des conditions métaboliques menant à l'obésité, au diabète de type 2 et à l'hypercholestérolémie, pathologies chroniques connues pour leur impact sur le risque cardiovasculaire, mais décrites aussi comme capables d'exacerber le vieillissement cérébral (Beck and Pourié, 2013). L'incidence de la MA est d'ailleurs plus élevée dans les pays consommant des régimes hypercaloriques à haute teneur en graisses majoritairement saturées (Refolo *et al.*, 2000). En effet, les dysfonctionnements métaboliques induits par ces régimes agiraient comme des stimulus pro-vieillessement sur de nombreux aspects biochimiques et physiologiques du cerveau allant jusqu'à favoriser le déclin cognitif et la démence (Uranga *et al.*, 2010). Des études sur le rat ont par exemple montré que l'exposition courte (20 jours environ) à des régimes riches en graisses majoritairement saturées ou en sucres altérait les capacités mnésiques et était associée à l'émergence d'une neuro-inflammation et d'un stress oxydant au niveau de l'hippocampe (Beilharz *et al.*, 2014). Chez des souris sauvages ou des souris modèles de MA (souris transgéniques Tg2576 ou souris subissant une injection intracérébrale de peptide A β), des régimes riches en lipides saturés, en sucre ou en cholestérol exacerbent l'amyloïdogenèse ainsi que les déficits mnésiques (Li *et al.*, 2003 ; Julien *et al.*, 2010 ; Maesako *et al.*, 2012 ; Davidson *et al.*, 2013 ; Park *et al.*, 2013 ; Moreira *et al.*, 2014). Par exemple, l'hypercholestérolémie plasmatique induite par l'alimentation chez la souris est associée à une augmentation significative des niveaux de peptide A β dans le SNC. Ces données démontrent qu'un taux élevé de cholestérol alimentaire augmente l'accumulation d'A β et accélère la pathologie liée à la MA dans ce modèle animal (Refolo *et al.*, 2000), tout comme un apport alimentaire élevé en cholestérol a été associé chez l'homme à un risque accru de démence en fin de vie (Sponne *et al.*, 2004 ; Oksman *et al.*, 2006 ;

Hartmann *et al.*, 2007 ; Ballard *et al.*, 2011). Cependant, si l'hypercholestérolémie plasmatique est un facteur de risque établi des accidents vasculaires cérébraux et des troubles cognitifs vasculaires, ses relations avec la MA sont plus mitigées et les résultats obtenus dans différentes études sont parfois divergents (Kume *et al.*, 2011 ; Blom *et al.*, 2013), tout comme les résultats obtenus sur l'effet des statines utilisées dans le traitement de l'hypercholestérolémie chez les patients à risque pour les maladies cardiovasculaires. Chez l'homme, des études épidémiologiques ont montré une diminution de la prévalence de la MA chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires suivant un traitement par des statines mais d'autres études n'ont pas corroborés ces résultats (Li *et al.*, 2007 ; Arvanitakis *et al.*, 2008 ; Panchal *et al.*, 2010 ; Shepardson *et al.*, 2011). Dans l'organisme, le cholestérol provient soit de la consommation de denrées alimentaires d'origine exclusivement animale, soit de la synthèse endogène. Bien que sa concentration plasmatique élevée constitue un facteur de risque pour de nombreuses pathologies, le cholestérol est un élément important au bon fonctionnement de l'organisme. Il est notamment primordial dans l'organisation et l'architecture des membranes cellulaires, particulièrement au niveau cérébral, ce qui sera décrit par la suite (Joseph *et al.*, 1997 ; Ledesma *et al.*, 2012). Un régime équilibré, qui limite les apports en lipides saturés et en glucides tout en surveillant le taux de cholestérol, semble donc constituer le chemin à suivre.

3. Les acides gras trans

Les acides gras *trans* (AGT) sont des AGI dont au moins une double liaison est en position *trans* (Figure 16), contrairement aux AGI synthétisés par l'organisme dont les doubles liaisons sont en position *cis* (ANSES, 2013a).

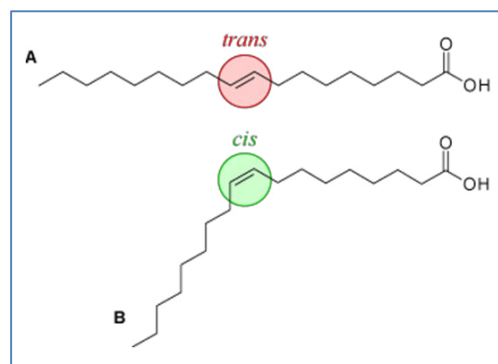


Figure 16 : Configuration cis et trans des acides gras

(d'après Niu *et al.*, 2005; Brouwer *et al.*, 2010)

La configuration *trans* correspond à une conformation linéaire de l'AG (A) tandis que la configuration *cis* correspond à une conformation coudée (B).

Les AGT peuvent être d'origine naturelle, produits dans l'estomac des ruminants puis incorporés dans la graisse corporelle et le lait des animaux, ou d'origine technologique, synthétisés par des procédés industriels comme l'hydrogénation des huiles végétales (Niu *et al.*, 2005; Brouwer *et al.*, 2010). L'industrialisation a considérablement augmenté la production d'aliments à haute teneur en AGT qui

représentent à l'heure actuelle 0,5 à 3% du total des calories consommées par la population selon les pays étudiés (Phivilay *et al.*, 2009). En 2005, l'ANSES a évalué que les apports moyens en AGT dans la population française étaient proches de 1,3% de l'apport énergétique total. Chez les adultes, 5% de la population ont une consommation atteignant le seuil limite fixé à 2%. Les individus les plus consommateurs sont les garçons de 12 à 14 ans qui en absorbent près de 8 g/j. En 2008, une nouvelle évaluation a permis de constater que les apports moyens en AGT avaient diminué à 1% et que chez les plus grands consommateurs, ils restaient inférieurs au seuil de 2% quels que soient l'âge et le sexe (ANSES, 2013a). Les AGT d'origine technologique sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire comme stabilisateurs et conservateurs et sont trouvés dans de nombreux produits alimentaires transformés comme les viennoiseries, les pizzas ou les margarines (Phivilay *et al.*, 2009). Leur consommation excessive (apports supérieurs à 2% de l'apport énergétique total) a été corrélée avec un risque accru de maladies coronariennes. Ces effets néfastes ont été associés à des modifications défavorables du profil des lipoprotéines du sérum, des TG plasmatiques et des marqueurs de l'inflammation comme la protéine C réactive, notamment une augmentation du cholestérol-LDL et une diminution du cholestérol-HDL (Niu *et al.*, 2005 ; Phivilay *et al.*, 2009 ; Brouwer *et al.*, 2010 ; ANSES, 2013a). De nombreuses études indiquent que la MA et les maladies cardiovasculaires partagent plusieurs facteurs de risque comme le diabète, le syndrome métabolique ou encore l'hypertension. Par conséquent, il est tentant de spéculer que l'apport alimentaire élevé en AGT pourrait augmenter le risque de MA parallèlement au risque cardiovasculaire. Cette hypothèse est étayée par une étude épidémiologique dans laquelle il a été constaté un risque relatif de MA 5 fois plus élevé chez les personnes âgées de 65 ans ou plus qui consomment environ 4,8 g/j d'AGT par rapport à celles qui n'en mangent que 1,8 g/j (Morris *et al.*, 2003). Par contre, une étude sur des souris transgéniques modèles de MA a montré qu'une consommation élevée d'AGT modulait les profils des AG cérébraux, avec notamment une augmentation des AG monoinsaturés (AGMI) et une diminution des AGPI, mais sans effet significatif sur les caractéristiques neuropathologiques principales de la MA, comme la production d'A β (Phivilay *et al.*, 2009). Bien qu'il existe encore peu de résultats sur les effets des AGT sur la MA, l'ANSES ne remet pas en cause ses recommandations visant à limiter leurs apports dans la population et souligne que la présence d'AGT d'origine industrielle dans les aliments se limite à un intérêt techno-fonctionnel (ANSES, 2013a).

4. La restriction calorique

La restriction calorique (RC) est une réduction modérée de l'apport alimentaire assurant néanmoins des apports qualitatifs suffisants pour n'induire ni carence, ni malnutrition. Elle est la seule intervention connue qui augmente la durée de vie dans de nombreux organismes, de la levure aux primates, suggérant qu'elle agisse par le biais de mécanismes conservés au cours de l'évolution (Bishop *et al.*, 2010 ; Piper *et al.*, 2011). Certaines études ont montré qu'une modification de l'équilibre des composants alimentaires sans réduction des apports globaux peut aussi augmenter la durée de vie d'insectes et de rongeurs. Ceci suggère que certains nutriments puissent impacter la longévité selon les quantités

apportées. Au contraire, d'autres études montrent que le génotype de l'organisme peut dans certains cas, affecter l'effet de la RC sur la longévité (Simpson and Raubenheimer, 2007, 2009 ; Liao *et al.*, 2010 ; Piper *et al.*, 2011).

Pour mieux comprendre ces mécanismes, des chercheurs ont développé une modélisation géométrique « *Geometric Framework* », qui considère la nutrition comme un espace à n-dimensions dans lequel les n-composants des régimes sont représentés sur des axes séparés. Les réponses des individus superposées dans ces n-dimensions permettraient d'inclure des changements phénotypiques quantifiables tels que la durée de vie, les paramètres métaboliques ou l'expression génique. Tous les niveaux de combinaison de nutriments dans les apports alimentaires peuvent donc être représentés dans cet espace, ce qui permet de combiner les données sur la consommation alimentaire issues de différentes expériences pour décrire comment un phénotype donné peut affecter une réponse. Ces représentations permettent par exemple de montrer que les conclusions sur la durée de vie peuvent différer selon les combinaisons de nutriments (Piper *et al.*, 2011). Des études montrent ainsi que l'équilibre entre glucides et protéines influe sur la durée de vie qui est allongée pour un ratio protéines/glucides faible chez la drosophile et d'autres espèces de mouches, ainsi que chez d'autres insectes comme les grillons (Figure 17).

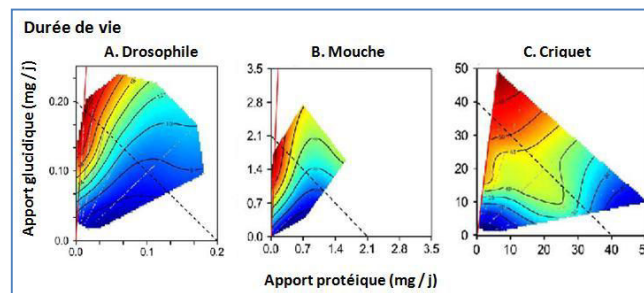


Figure 17: Modélisation géométrique de l'influence de l'alimentation sur la longévité d'insectes

(d'après Simpson and Raubenheimer, 2009)

La représentation « *Geometric framework* » est une modélisation espace-état qui explore la façon dont les animaux équilibrent leur alimentation en fonction de l'évolution des besoins dans un environnement nutritionnel multidimensionnel et variable. Les sujets ont accès à l'alimentation *ad libitum*. Les axes sont représentés par les rapports entre concentrations totales de protéines et de glucides (P/G). L'apport en nutriments de diverses études est représenté par des surfaces à deux variables, allant du bleu foncé au rouge foncé. La ligne rouge continue indique le ratio P/G qui maximise la réponse à la longévité tandis que la ligne bleue en pointillés indique les apports isocaloriques. Tous les insectes étudiés, drosophile (A), mouche Queensland (B) et criquet des champs (C), présentent une durée de vie allongée lorsque le régime alimentaire contient un faible ratio P/G et diminuée quand ce rapport P/G est élevé.

Cet effet peut résulter de la RC, mais surtout de l'équilibre entre ces nutriments. La durée de vie serait aussi augmentée par la restriction protéique, plus particulièrement de la méthionine chez les rongeurs. Cependant, chez ces derniers, les lipides et les AG représentent une part importante de l'alimentation qu'il faut donc inclure dans ce modèle de représentation afin d'étudier le milieu nutritif au complet. Pour l'homme, le même problème se pose, en raison de la diversité de la composition du régime alimentaire et de l'importance des mécanismes sous-jacents (production d'ERO, modification du métabolisme oxydant, effets toxiques des produits de dégradation azotés, toxines alimentaires, voie insulinaire, etc.) (Simpson and Raubenheimer, 2007, 2009). Cette représentation géométrique permet d'appréhender toute la complexité des réponses moléculaires et physiologiques d'un organisme à son

alimentation et à son environnement. Même si elle ne résout pas les difficultés mécanistiques sous-jacentes des interactions gène-environnement dans le vieillissement, elle offre un outil pour l'exploration de ces phénomènes (Piper *et al.*, 2011).

Selon diverses études, la longévité pourrait varier largement en fonction de déterminants génétiques (Liao *et al.*, 2010). Par exemple, les souris naines Ames sont homozygotes pour une mutation *df* du gène codant pour le facteur de croissance *Prop1* (*Prophet of Pituitary factor1*), ce qui conduit à un déficit en facteurs de croissance, en prolactine et en TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*), ainsi qu'à une suppression périphérique de l'IGF. Les souris portant la mutation *Prop1^{df}* sur ce gène, dit de longévité, présentent une durée de vie 50% plus longue que les souris sauvages, ce qui en fait un modèle génétique de vieillissement retardé et de grande longévité (Bartke *et al.*, 1999 ; Miquet *et al.*, 2005). D'un point de vue phénotypique, ces dernières ressemblent aux souris sauvages dont la durée de vie serait augmentée par RC. La durée de vie des souris mutantes peut elle-même être encore allongée sous l'effet d'une RC (Figure 18). Le profil des courbes de survie de ces animaux suggère que la RC ralentit le vieillissement, tandis que l'allèle *Prop1^{df}* semble le retarder. Une régulation hormonale et l'implication d'hormones de croissance, plus particulièrement de l'IGF, pourraient être à l'origine de ces effets (Bartke *et al.*, 1999).

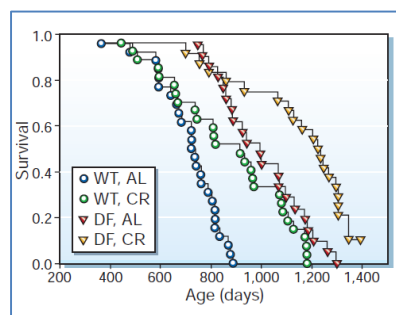


Figure 18 : Survie de souris Ames et sauvages sous restriction calorique ou sous régime ad libitum

(d'après Bartke *et al.*, 2001)

Les souris Ames, homozygotes pour une mutation du gène codant pour le facteur de croissance *Prop1* (*DF*) présentent une survie (survival) plus longue d'environ 50% que les souris sauvages issues de la même portée (*WT*) ayant libre accès à leur nourriture (*AL*), mais une durée de vie équivalente aux souris sauvages sous restriction calorique (*CR*). Les souris mutantes sous *CR* présentent une durée de vie très légèrement allongée mais surtout un ralentissement du vieillissement, visible par le décalage de la courbe de survie qui témoigne d'une survie plus importante. Si l'allèle muté *Prop1^{df}* semble retarder le vieillissement, la restriction calorique, quant à elle, semble en ralentir les effets.

Des caractères génétiquement définis influencent donc la réponse des organismes à la RC et la voie insulinaire semble être particulièrement importante (Piper *et al.*, 2011). En effet, des mutations affectant la voie de l'insuline ou les voies homologues peuvent augmenter la durée de vie des vers, mouches et souris. La réduction de la sécrétion des facteurs de croissance IGF ou IGF-like sont parmi les mécanismes qui rendent possible les effets de la RC sur le vieillissement et la durée de vie des mammifères (Bonkowski *et al.*, 2006 ; Witte *et al.*, 2009). Des analyses transcriptomiques ont pu mettre en évidence que la RC induit l'expression d'autres gènes impliqués notamment dans la réponse au stress oxydant, comme des gènes codant pour des antioxydants, les métallothionéines, des protéines de l'inflammation comme NF- κ BIA (*Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in β -cells Inhibitor Alpha*) et des inhibiteurs de

métalloprotéinases comme Timp3 (*Tissue Metallopeptidase Inhibitor 3*) ou des protéines impliquées dans la tumorigenèse telle que Txnip (*Thioredoxin Interacting Protein*). La RC régule également la coexpression de gènes associés au métabolisme et à l'épissage de l'ARNm, comme CPSF6 (*Cleavage and Polyadenylation Specific Factor 6*), qui intervient dans le clivage et la polyadénylation en 3' des ARNm (Swindell, 2009).

La RC a aussi des effets bénéfiques sur les fonctions cérébrales et leur vulnérabilité aux pathologies liées au vieillissement. En effet, chez les rongeurs comme chez l'homme, elle permettrait d'améliorer les capacités d'apprentissage et de mémorisation (Figure 19) (Bellush *et al.*, 1996 ; Witte *et al.*, 2009 ; Bishop *et al.*, 2010) en retardant les déficiences liées à l'âge, mais sans les empêcher car son effet s'amenuise, voire disparaît, chez les groupes très âgés (Stewart *et al.*, 1989). Dans le cas de modèle de souris Alzheimer, la RC améliore la locomotion, le comportement exploratoire et diminue les taux des peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ dans l'hippocampe ainsi que le niveau de phosphorylation de Tau, deux mécanismes mis en jeu dans la pathogenèse de la MA (Halagappa *et al.*, 2007).

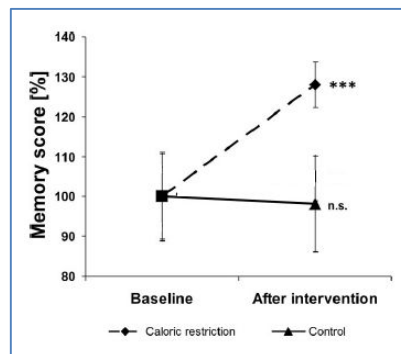


Figure 19: Évolution des performances mnésiques de personnes âgées sous restriction calorique

(d'après Witte *et al.*, 2009)

La restriction calorique améliore les performances mnésiques. Chez l'homme, les capacités mnésiques (memory score) augmentent significativement après une restriction calorique (after intervention, caloric restriction, trait en pointillés) comparativement aux valeurs de bases (baseline, carré) et au groupe contrôle (control, trait plein), soumis à une alimentation standard.

La RC est une intervention qui améliore la durée de vie des animaux de laboratoire et cette technique est largement utilisée pour examiner les facteurs de cette longévité. Cependant, certains chercheurs la remettent en cause car ses effets sur l'homme ne sont pas prouvés. Les études nécessaires sont particulièrement complexes à mettre en place, nécessitant une procédure lourde pour les volontaires et un suivi extrêmement long pour détecter les éventuels problèmes induits par la restriction. Par ailleurs, une étude sur le chien a montré que la RC peut induire des carences en sélénium et en vitamine B (choline) qui mènent à une anorexie, une dépression, une dyspnée, des troubles neurologiques et à terme un coma (Linder *et al.*, 2012). De plus, une analyse de la littérature sur une période de 4 ans a mis en évidence que la plupart des protocoles les plus couramment utilisées emploient une restriction sans supplémentation en vitamines et en minéraux, ce qui conduit à une malnutrition des souris et des rats (Cerqueira and Kowaltowski, 2010). Enfin, des données obtenues sur le rat montrent des effets contradictoires de la RC où certes, il y a bien une augmentation de la longévité, mais avec une diminution des performances cognitives

dans les âges très avancés (Yanai *et al.*, 2004). En résumé, la RC est une approche controversée, plutôt utopiste, qu'il faut considérer avec précaution car la frontière entre réduction de l'apport alimentaire et malnutrition semble étroite et très souvent facilement franchie.

5. Les vitamines, antioxydants et polyphénols

Il a été décrit précédemment que la production de radicaux libres augmente au cours du vieillissement, concordant avec une baisse des défenses antioxydantes. Dans la MA, l'accumulation de peptide amyloïde s'accompagne de phénomènes inflammatoires et de stress oxydant qui se surajoutent à l'inflammation chronique associée au vieillissement cérébral. Le cerveau est particulièrement vulnérable au stress oxydant en raison de sa composition riche en lipides, sensibles à la peroxydation, et en glucose, favorisant la glycation non enzymatique des protéines. Parallèlement, le cerveau est relativement pauvre en systèmes enzymatiques antioxydants. L'ensemble de ces processus accentue davantage la nécessité d'inclure dans le régime des aliments riches en antioxydants exogènes (Elmadfa and Meyer, 2008 ; Joseph *et al.*, 2009 ; Mathers, 2013). Les nutriments à effet anti-inflammatoire ou antioxydant ont donc été très étudiés dans la lutte contre le phénomène de vieillissement, mais aussi dans le but de limiter l'impact des lésions neurodégénératives et ainsi retarder le cours de la MA.

De nombreux micronutriments possèdent des propriétés antioxydantes : vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols, cofacteurs des enzymes antioxydants comme le sélénium ou le zinc (McCormick, 2012 ; Morris, 2012). Les polyphénols alimentaires sont apportés par les fruits, les légumes, dans une moindre mesure le vin, et principalement le thé qui arrive largement en tête des aliments sources de polyphénols dans l'alimentation des Français (Joseph *et al.*, 2009 ; Santhakumar *et al.*, 2014). Une étude sur le rat âgé de 15 mois a montré qu'un régime alimentaire enrichi en polyphénols durant 4 mois permet d'améliorer la mémoire de travail, ainsi que les performances mnésiques lors du test de reconnaissance d'objets, en parallèle aux fonctions motrices et de coordination. Chez ces mêmes rats, une diminution des niveaux de NF- κ B, impliqué dans la réponse au stress oxydant et à l'inflammation, a été rapportée dans différentes zones du cerveau (Goyarzu *et al.*, 2004). Par ailleurs, chez l'homme, plusieurs études épidémiologiques ont avancé une association inverse entre la consommation de fruits et légumes et le risque de déclin cognitif ou de survenue d'une démence. Par exemple, dans l'étude 3C des « 3Cités » (Bordeaux, Dijon et Montpellier) réalisée sur une cohorte de 8.085 participants non déments âgés de 65 et plus, une consommation quotidienne de fruits et légumes a été associée à un risque plus faible de 30% de développer une démence durant les 4 ans de suivi des patients (Barberger-Gateau *et al.*, 2007). En outre, l'impact de la consommation de fruits et légumes sur la tension artérielle, facteur de risque de démence, a été confirmé lors de l'étude DASH (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*) (Gu and Scarmeas, 2011).

Les données relatives à l'alimentation et au risque de déclin cognitif et de MA suggèrent l'importance d'une combinaison équilibrée de plusieurs nutriments antioxydants pour exercer un effet préventif significatif. S'il a été observé une diminution des niveaux de vitamines A et E lors du vieillissement,

des données épidémiologiques suggèrent aussi un rôle protecteur des vitamines B sur le déclin cognitif et la démence (Gillette Guyonnet *et al.*, 2007 ; Hausman *et al.*, 2011). En effet, un déficit de l'apport alimentaire en vitamines du groupe B (B6, B9 ou folates, B12) entraîne une hyperhomocystéinémie, facteur de risque vasculaire associé à un risque accru de démence et qui peut aussi s'avérer neurotoxique (Selhub *et al.*, 2010 ; Hausman *et al.*, 2011). Pourtant, la plupart des études d'intervention qui ont administré des combinaisons d'antioxydants ou des vitamines du groupe B sous forme de compléments alimentaires, le plus souvent à des doses très supérieures aux AJR, se sont souvent avérées décevantes et ont donné des résultats contradictoires. Le chien est largement utilisé comme modèle pour l'étude des effets des antioxydants du fait d'un régime alimentaire et d'un métabolisme proches de ceux de l'homme, ainsi que de sa susceptibilité au stress oxydant et de sa capacité à développer un déclin cognitif avec l'âge. Pour ce modèle, l'administration d'acétyl-L-carnitine, d'acide lipoïque ou d'un mélange de vitamines dont E et C a souvent été employée et a démontré des effets bénéfiques sur la cognition et les performances de mémoire spatiale. Ils permettent de diminuer la production d'ERO et l'oxydation des protéines, lipides et ADN (réduction des groupements carbonyles et de la peroxydation lipidique dans le cerveau), et d'améliorer les fonctions mitochondriales et l'activité antioxydante endogène (Opii *et al.*, 2008 ; Head, 2009 ; Head *et al.*, 2009 ; Dowling and Head, 2012 ; Snigdha *et al.*, 2012). L'expression de protéines cérébrales clés impliquées dans le métabolisme énergétique et les systèmes antioxydants est aussi augmentée, tandis que les structures cellulaires sont maintenues et stabilisées (Opii *et al.*, 2008). Les effets bénéfiques constatés seraient améliorés si, parallèlement au régime alimentaire, l'animal bénéficie d'un enrichissement du comportement grâce à de l'exercice physique, une expérience cognitive et un environnement sensoriel amélioré (Head, 2009). Une autre étude a montré une réduction significative de l'anxiété et du stress ainsi qu'une amélioration de la vigilance chez une cinquantaine d'hommes âgés de 50 à 69 ans ayant reçu durant 8 semaines une formulation de multiples vitamines, à des niveaux supérieurs à ceux recommandés, contenant des minéraux (zinc, potassium, calcium, magnésium, etc.), des vitamines (C, E et mélanges de vitamines B), des antioxydants et des extraits de plantes (fruits et légumes, ginseng, *Ginkgo biloba*, etc.) (Harris *et al.*, 2011). Des méta-analyses ont conduit à plusieurs remarques importantes. Une étude prospective sur 4.740 sujets a pu associer l'administration combinée de vitamine E à la dose de 400 mg/j (AJR : 20 mg/j) et de vitamine C à la dose de 500 mg/j (AJR : 100 à 120 mg/j) pendant au moins 3 ans à la réduction de la prévalence et de l'incidence de la MA. Cependant, cette étude contredit un examen précédent sur 980 sujets qui n'a détecté aucun effet (Boothby and Doering, 2005), tout comme d'autres analyses regroupant 232.500 participants sur 67 essais cliniques randomisés qui n'ont révélé aucune preuve significative de l'effet des antioxydants (β -carotène, vitamine A, vitamine C, vitamine E et sélénium) en prévention primaire (sur sujets sains) et secondaire (sur sujets atteints d'une maladie) (Bjelakovic *et al.*, 2008 ; Cooper, 2014). De plus, à de telles doses, la vitamine E peut devenir pro-oxydante. En effet, des études ont permis d'associer une supplémentation en vitamine E à une dose égale ou supérieure à 400 mg/j pendant plus d'un an à une augmentation de la mortalité toutes causes confondues. Plus généralement,

une supplémentation en vitamines A, E ou en β -carotène pour la prévention primaire ou secondaire de diverses affections s'accompagne d'une augmentation de la mortalité de 4 à 16% (Boothby and Doering, 2005 ; Bjelakovic *et al.*, 2008), bien que chez le rat âgé une supplémentation en vitamine A limite les altérations mnésiques liées au vieillissement (Touyarot *et al.*, 2013). En l'absence d'essais cliniques prospectifs, randomisés et contrôlés, destinés à démontrer un rapport bénéfices/risques réellement favorable, la supplémentation en vitamine E ne devrait pas être recommandée pour prévenir la MA. Bien que les risques liés à la prise de fortes doses de vitamines C et A soient inférieurs à ceux de la vitamine E, le manque de données sur l'efficacité de celles-ci dans la prévention ou le traitement de la MA devrait décourager son utilisation en routine à cet effet. En conclusion, les compléments en antioxydants doivent être considérés comme des produits médicaux et avant toute commercialisation ou recommandation, devraient à ce titre faire l'objet d'une évaluation rigoureuse et précise de leurs propriétés et activités biologiques, notamment dans le contexte des maladies neurodégénératives. Si de nombreuses études chez l'animal ont montré des effets bénéfiques des antioxydants, il semble que la réalité chez l'homme fasse intervenir d'autres paramètres qu'il reste encore à définir (Gillette Guyonnet *et al.*, 2007 ; Gu and Scarmeas, 2011 ; McCormick, 2012 ; Morris, 2012).

6. Les acides gras polyinsaturés

Une autre piste de recherche concerne les effets potentiellement protecteurs des AGPI de type *n-3* apportés principalement, au moins pour les AG à longue chaîne, par la consommation de poissons gras. Des recommandations pour les apports nutritionnels en AGPI *n-6* et *n-3* ont été formulées pour garantir un apport nutritionnel suffisant et prévenir les principales maladies chroniques, cardiovasculaires et neurodégénératives. Pour établir ces AJR, l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES) a suivi une démarche novatrice en considérant à la fois le besoin physiologique en lipides, qui correspond à ce dont l'organisme a besoin pour assurer son fonctionnement, et le besoin physiologique optimal, visant la prévention de pathologies comme le syndrome métabolique, le diabète, l'obésité, les maladies cardiovasculaires, les cancers et d'autres pathologies telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ou la MA. Pour un adulte, le besoin physiologique minimal en AG totaux doit couvrir 30% de l'apport énergétique, soit l'équivalent de 77,8 g/j d'AG (ANSES, 2013c). Les AJR en AGPI ont été revus à la hausse ces dernières années, passant ainsi de 2 à 4% de l'apport énergétique pour l'acide linoléique (LA, *n-6*), soit 8,88 g/j, et de 0,8 à 1% pour l'acide α -linoléique (ALA, *n-3*), soit 2,22 g/j. Les nouvelles recommandations des comités de nutrition pour l'acide docosahexaénoïque (DHA, *n-3*) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA, *n-3*) évoquent des niveaux à peine supérieurs à 0,1% de l'apport énergétique, soit 250 mg/j (Simopoulos *et al.*, 2000 ; ANSES, 2013b). À l'heure actuelle, aucun indice existant ne peut suggérer le moindre effet toxique de ces AGPI à ces doses. Une caractéristique inquiétante des régimes occidentaux est le déséquilibre croissant entre les AGPI de type *n-6* et *n-3* qui peut limiter la disponibilité de certains AGPI pour les tissus et entraîner une carence en AGPI *n-3*. En effet, les

teneurs en AGPI *n*-6 des régimes occidentaux ont considérablement augmenté au cours des années, tandis que l'apport en AGPI *n*-3 est resté globalement inchangé. Ce phénomène est principalement lié à la surconsommation d'huile végétale riche en LA et pauvre en ALA, ce qui accroît le ratio d'AGPI *n*-6/*n*-3.

Plusieurs éléments de preuve suggèrent qu'un apport nutritionnel adéquat en AGPI *n*-3 tout au long de la vie peut préserver la fonction cognitive des personnes âgées et prévenir de l'apparition de plusieurs pathologies associées au vieillissement (Lavialle and Layé, 2010 ; Slee *et al.*, 2010 ; Solfrizzi *et al.*, 2010 ; Bazan *et al.*, 2011 ; Denis *et al.*, 2013). En effet, de nombreuses études épidémiologiques ont analysé la relation entre la consommation d'AGPI *n*-3 et le risque de déclin cognitif ou de démence. Certaines ont d'ailleurs démontré l'existence d'une relation inverse entre les concentrations plasmatiques en EPA ou DHA et le risque de démence ou de déclin cognitif avec des teneurs en AGPI *n*-3 plus faibles dans le plasma des patients atteints de MA (Conquer *et al.*, 2000 ; Schaefer *et al.*, 2006 ; Cunnane *et al.*, 2013). Des études alimentaires comme l'étude 3C montre que la consommation hebdomadaire de poisson, tout comme la consommation d'huiles riches en AGPI *n*-3, est associée à un risque diminué de 40% de développer une démence dans les quatre ans, toutes causes confondues, chez les sujets non porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E. En revanche, la consommation régulière d'huile riche en AGPI *n*-6, sans compensation par un apport en AGPI *n*-3, a été associée à un risque de démence accru de 50% (Barberger-Gateau *et al.*, 2007). L'étude MIDAS (*Memory Improvement with DHA Study*), essai randomisé en double aveugle contre placebo sur 485 participants, a montré qu'une administration quotidienne de 900 mg de DHA pendant 24 semaines permet d'améliorer les résultats à certains tests de mémoire chez des sujets âgés de plus de 54 ans, se plaignant de troubles mnésiques et ayant de moins bonnes performances cognitives que des sujets jeunes (Yurko-Mauro *et al.*, 2010a). Malgré ces données, comme pour les antioxydants, la plupart des essais cliniques standardisés basés sur des apports contrôlés en EPA ou DHA administrés chez des sujets âgés à des doses variables, généralement comprises entre 400 et 2.300 mg/j mais presque toujours très supérieures aux AJR, se sont avérés décevants et discordants pour la prévention primaire ou secondaire du déclin cognitif (Kotani *et al.*, 2006 ; van de Rest *et al.*, 2008 ; Cederholm and Palmblad, 2010 ; Dangour *et al.*, 2010 ; Quinn *et al.*, 2010). Par exemple, un essai randomisé en double aveugle sur 867 participants âgés de 70 à 79 ans en bonne santé cognitive n'a prouvé aucun effet sur les performances mnésiques en conséquence de l'absorption quotidienne de capsules contenant 200 mg d'EPA et 500 mg de DHA sur 24 mois (Dangour *et al.*, 2010). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces divergences, parmi lesquelles l'influence potentielle du statut en apolipoprotéine E qui pourrait moduler les effets d'une supplémentation en AGPI selon les individus par modification du métabolisme de ces AG (Cole and Frautschy, 2006 ; Cunnane *et al.*, 2013). Plusieurs études ont par ailleurs constaté que l'efficacité protectrice d'une supplémentation en AGPI *n*-3, et plus particulièrement en DHA, sur les troubles cognitifs est plus élevée lorsqu'elle est réalisée durant les stades précliniques et dépend du mode, de la précocité, de la fréquence et de la durée de son administration, ainsi que du temps de suivi des participants (Jicha et Markesbery, 2010 ; Solfrizzi *et al.*, 2010 ; Morris, 2012).

7. Le régime méditerranéen

Vu l'abondance des analyses épidémiologiques et la complexité des mécanismes neurotoxiques enclenchés lors de la pathogenèse de la MA, il est très peu probable qu'un composé isolé et unique puisse conférer une protection absolue contre la démence. Il est en effet difficile d'attribuer spécifiquement à un nutriment donné des effets protecteurs aussi larges et variés qu'il le nécessiterait. C'est pourquoi, une attention spéciale s'est portée sur le régime de type méditerranéen dans la prévention du déclin cognitif. Ce régime alimentaire est caractérisé par une forte consommation d'aliments d'origine végétale (légumes, fruits, légumineuses et céréales) et d'huile d'olive comme principale source de matière grasse, un apport modéré de poisson, peu de produits laitiers ou de viande et de faibles quantités de vin rouge lors des repas (Scarmeas *et al.*, 2006 ; Gu and Scarmeas, 2011 ; Féart *et al.*, 2013). Il combine finalement plusieurs micro- et macronutriments (AGPI, antioxydants, polyphénols, etc.) déjà proposés séparément comme potentiellement protecteurs contre la démence et les syndromes pré-démenciels (Solfrizzi *et al.*, 2011). L'intérêt pour cette alimentation émane d'une étude, menée sur différentes cohortes de plus de 11.000 personnes dans 7 pays différents, qui a démontré l'association de ce régime à une meilleure espérance de vie à l'âge adulte et à un taux de maladies coronariennes très faible (Keys *et al.*, 1986). Depuis la publication de cette étude, la popularité de l'alimentation méditerranéenne s'est répandue dans le monde entier et les études scientifiques ne cessent d'essayer de prouver son efficacité pour la prévention de diverses maladies et notamment du déclin cognitif. Des études aux États-Unis et en France ont montré d'ailleurs que le suivi d'un régime méditerranéen est associé à un déclin cognitif plus lent, à une incidence réduite du MCI et à une plus faible conversion de MCI en MA (Scarmeas *et al.*, 2006 ; Féart *et al.*, 2009, 2013 ; Gu and Scarmeas, 2011 ; Solfrizzi *et al.*, 2011 ; Mathers, 2013). Cependant, les résultats restent contradictoires car certaines études n'ont pas réussi à prouver cette association sans pour autant décrire un quelconque effet négatif. Pour le moment, aucune recommandation diététique définitive n'a été proposée (Scarmeas *et al.*, 2006 ; Féart *et al.*, 2009, 2013 ; Gu and Scarmeas, 2011 ; Solfrizzi *et al.*, 2011).

8. L'attrait des industriels agro-alimentaires

Les industriels ont vite compris l'intérêt financier de développer des gammes de produits alimentaires aux effets bénéfiques pour la santé. Ainsi depuis plusieurs années, ils mettent en avant les allégations nutritionnelles et de santé dans toutes leurs campagnes de marketing et de publicité avec par exemple, des mentions telles que « faible teneur en graisse », « riche en vitamines », « source d'acides gras oméga-3 » ou « enrichi en polyphénols ». Certains industriels lancent même leur propre recherche afin de prouver l'efficacité de leurs produits sur certaines maladies. L'hypothèse selon laquelle la combinaison de nombreux nutriments pourrait stimuler la formation de nouvelles synapses et plus directement améliorer l'état des patients souffrant d'une MA est d'ailleurs à la base du développement d'une boisson lactée

appelée Souvenaid® proposée par Danone. Cette boisson est composée entre autres d'un mélange de DHA et d'EPA, de vitamines (A, B dont la choline, C, D et E) et de divers oligo-éléments et minéraux (sélénium, sodium, potassium, calcium, magnésium, fer, etc.). Deux études cliniques, financées par Danone, ont été menées pour étudier l'effet de Souvenaid® chez des patients atteints de MA à des stades précoces. Ces études ont montré, une amélioration de la situation nutritionnelle puisque tous les nutriments contenus dans la boisson étaient absorbés et leurs taux augmentés dans le sang des patients. Concernant les effets sur la mémoire, la première étude clinique menée en double aveugle sur 225 patients de plus de 50 ans, tous au stade précoce et ne prenant aucun traitement contre la MA, a montré qu'après une période de 12 semaines, 40% des patients recevant Souvenaid® bénéficiaient d'une amélioration de leur mémoire contre 24% dans le groupe placebo bien que le test d'évaluation cognitive n'ait pas été amélioré. Une autre étude, menée en Europe sur 259 sujets dans les mêmes conditions que la précédente sur 24 semaines, a montré une augmentation du score à des tests neuropsychologiques et un progrès de l'électroencéphalogramme, ce qui a été interprété comme une amélioration de l'activité fonctionnelle cérébrale. Cependant, ces résultats restent à nuancer car aucun biomarqueur n'a été utilisé pour le diagnostic de MA des patients et surtout après 12 semaines, un effet sur la mémoire a été objectivé dans le groupe contrôle, pouvant résulter d'un effet placebo ou d'éléments d'apprentissage et de familiarité des patients avec les tests (Scheltens *et al.*, 2010, 2012).

L'alimentation dans son ensemble apporte de nombreux nutriments pouvant contribuer à ralentir le vieillissement cérébral. Une alimentation variée et équilibrée apporte au cerveau, à dose nutritionnelle, des nutriments aux effets synergiques permettant de ralentir le déclin cognitif lié au vieillissement, voire de retarder l'apparition des signes cliniques de démence. Pourtant, les études interventionnelles avec des suppléments à hautes doses se sont pour la plupart avérées très décevantes, tant à des fins de prévention que de traitement. La recherche doit donc poursuivre ses efforts pour identifier les conditions optimales d'une supplémentation, notamment la période, la durée et la dose pertinentes, les caractéristiques de la population susceptible d'en bénéficier et les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu.

B. Les AGPI, des acides gras particuliers

La littérature est abondante sur les études des sources d'AG identifiées comme bonnes ou mauvaises pour l'homme. De nombreux effets physiologiques bénéfiques ont été attribués aux AGPI de la classe des *n-3*. Ils sont de plus en plus largement identifiés comme des composés indispensables au bon fonctionnement de l'organisme et suscitent un intérêt tout particulier dans le cadre de la prévention ou du traitement thérapeutique de pathologies très diverses.

1. Nomenclature

Les AG sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe saturée ou insaturée composés d'une chaîne linéaire carbonée portant un groupement méthyle à une extrémité et carboxyle à l'autre. Leur nomenclature repose sur le nombre d'atomes de carbone (4 à 36) et le nombre de doubles liaisons (0 à 8), ainsi que sur les propriétés physicochimiques qui en dépendent. Par convention, la nomenclature internationale biochimique les note selon la formule générale $[C_{x:y}n-z]$, où x représente le nombre d'atomes de carbone (le carbone du groupement carboxyle est toujours noté 1 et les autres portent leur numéro d'ordre), y le nombre de doubles liaisons dans la molécule et z la position du carbone impliqué dans la double liaison la plus proche de l'extrémité méthyle. Une seconde nomenclature est utilisée notamment par les nutritionnistes, désignée par le terme « nomenclature oméga » où oméga (ω) définit la position de la double liaison la plus proche du groupement méthyle terminal. Par ailleurs, les AG font également l'objet d'une nomenclature usuelle (Tableau VI) (IUPAC-IUB, 1977).

Tableau VI : Nomenclature des principaux acides gras

(d'après IUPAC-IUB, 1977; Cuvelier *et al.*, 2004)

Nomenclature usuelle	Nomenclature biochimique
Acides gras saturés	
Acide laurique	C12:0
Acide myristique	C14:0
Acide palmitique	C16:0
Acide stéarique	C18:0
Acides gras monoinsaturés	
Acide palmitoléique	C16:1n-7
Acide oléique	C18:1n-9
Acides gras polyinsaturés	
Acide linoléique (LA)	C18:2n-6
Acide α -linoléique (ALA)	C18:3n-3
Acide stéaridonique (SDA)	C18:4n-3
Acide arachidonique(ARA)	C20:4n-6
Acide eicosapentaénoïque (EPA)	C20:5n-3
Acide docosapentaénoïque (DPA)	C22:5n-3
Acide docosahexaénoïque (DHA)	C22:6n-3

D'un point de vue biochimique, les AG peuvent aussi être caractérisés d'AG à courte, moyenne ou longue chaîne carbonée et d'AGS, d'AGMI et d'AGPI selon leur degré d'insaturation (IUPAC-IUB, 1977; Cuvelier *et al.*, 2004). La longueur de la chaîne carbonée intervient notamment dans la solubilité de l'AG. Plus la chaîne est longue, plus la solubilité des molécules dans l'eau est faible. L'augmentation du degré d'insaturation est quant à elle associée à une diminution du point de fusion (Cuvelier *et al.*, 2004; Legrand, 2007)

2. Essentialité, précurseurs et conversion des acides gras

D'un point de vue physiologique, les AG peuvent être classés comme indispensables ou non à l'organisme. Il est ainsi distingué d'une part, les AG non essentiels et non indispensables que l'organisme est capable de synthétiser et d'autre part, les AG essentiels, indispensables et nécessaires au développement et au fonctionnement de l'organisme et qu'il ne sait pas synthétiser et qui doivent être apportés par l'alimentation. Parmi les AG non essentiels, les AGS sont synthétisés en particulier dans le foie, le cerveau et le tissu adipeux. Avec ceux apportés par l'alimentation, ce sont des constituants des phospholipides (PL), des sphingolipides et des TG de réserve qui assurent une part importante de la dépense énergétique. Les principaux AGS sont les acides laurique, myristique, palmitique et stéarique. Les AGMI proviennent eux aussi de la synthèse endogène et de l'alimentation. La synthèse endogène fait intervenir une désaturase qui introduit une double liaison sur l'acide palmitique ou l'acide stéarique pour former respectivement l'acide palmitoléique (C16:1n-7) et l'acide oléique (C18:1n-9), les deux principaux AGMI. Ils sont utilisés comme source d'énergie et sont estérifiés dans tous les types de lipides, particulièrement l'acide oléique qui est quantitativement le plus présent. Les principaux AGPI sont quant à eux issus de l'acide oléique par une suite de réactions d'élongation et de désaturation et la position de la première insaturation permet de distinguer deux familles d'AG essentiels : les AGPI n-6 et les AGPI n-3, aussi nommés respectivement ω 6 et ω 3 (Yehuda *et al.*, 2002 ; Ledesma *et al.*, 2003 ; Legrand, 2007 ; Lavalie and Layé, 2010 ; Bazan *et al.*, 2011). Ces deux familles dérivent de précurseurs métaboliques, ALA pour la série n-3 et LA pour la série n-6 (Lavalie and Layé, 2010 ; Bazan *et al.*, 2011).

Le métabolisme des mammifères ne permet pas de produire de l'ALA et LA, contrairement aux végétaux qui disposent des enzymes Δ 12 et Δ 15 désaturases nécessaires à leur synthèse respective à partir de l'acide oléique. Ces précurseurs des séries d'AG n-3 et n-6 doivent donc être apportés à l'organisme par la consommation d'huiles végétales extraites principalement des pépins de raisin, du tournesol, de noix, de maïs et de soja pour le LA et de lin, de noix et de colza pour l'ALA (Figure 20) (Calder, 2012 ; ANSES, 2013c).

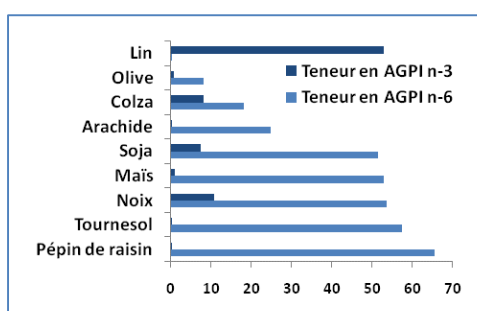


Figure 20: Teneur en AGPI n-6 et n-3 d'huiles végétales

(d'après ANSES, 2013b)

Les valeurs sont indiquées en g pour 100 g d'huile. La teneur en AGPI n-6 est la plus importante dans l'huile de pépin de raisin puisqu'elle en représente 65,6% tandis que pour celle des AGPI n-3, l'huile de lin est en tête avec une teneur à 53%.

Bien que les mammifères ne puissent synthétiser les précurseurs, ils les métabolisent pour former d'autres dérivés à plus longue chaîne et plus insaturés, par une série de réactions de désaturation et

d'élargissement consécutives qui se déroulent principalement dans le RE. Les liaisons doubles et les 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 21).

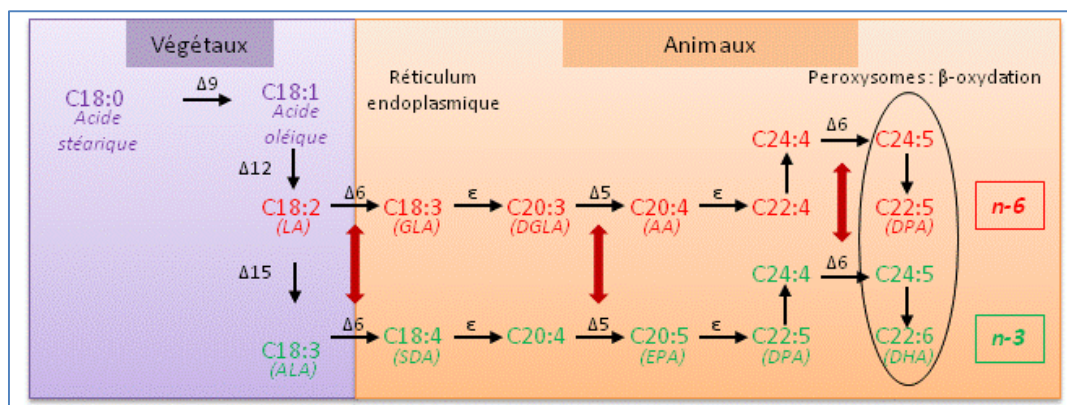


Figure 21: Conversion des précurseurs d'AGPI n-6 et n-3

(d'après Arterburn *et al.*, 2006; Legrand, 2007)

Le symbole Δ indique une désaturation avec la place de la double liaison introduite repérée à partir du groupe carboxyle. Le symbole ϵ indique une élongation. Toutes les étapes se passent dans le réticulum endoplasmique sauf celles indiquées dans le cercle noir, qui se déroulent dans les peroxysomes. Les précurseurs LA et ALA des familles *n*-6 et *n*-3 constituent des AG essentiels devant être apportés par l'alimentation dont la conversion en AG à chaîne plus longue repose sur l'utilisation compétitive des mêmes désaturases et élongase, indiquées par la flèche rouge à double sens.

Par exemple, la conversion ALA \rightarrow EPA comporte une première désaturation par la $\Delta 6$ -désaturase qui insère une double liaison dans la molécule pour former le SDA. Ce dernier peut alors être allongé en acide eicosatétraénoïque (C20:4n-3) par une élongase qui ajoute deux carbones à l'AG précurseur, avant sa conversion par la $\Delta 5$ -désaturase qui génère l'EPA. La conversion ALA \rightarrow EPA est en compétition avec la conversion LA \rightarrow ARA, puisque les mêmes enzymes sont utilisées pour chaque série *n*-3 et *n*-6. En effet, la première étape de la voie impliquant la $\Delta 6$ -désaturase est commune, expliquant que la mise en place initiale de la double liaison soit la réaction limitante d'un point de vue cinétique. Bien que l'affinité de l'enzyme soit plus élevée pour l'ALA que pour le LA, le déséquilibre alimentaire en faveur des AG *n*-6 implique que des concentrations de LA supérieures conduisent à une conversion plus importante en *n*-6 au détriment des *n*-3. La conversion finale ALA \rightarrow DHA nécessite une translocation vers le peroxysome pour une réaction de β -oxydation, étape considérée comme délicate par certains auteurs qui expliquent ainsi la faible biosynthèse de DHA chez les mammifères. De plus, la $\Delta 6$ -désaturase participe à cette étape de conversion DPA \rightarrow DHA, ce qui peut aussi limiter l'efficacité de la réaction (Arterburn *et al.*, 2006 ; Williams and Burdge, 2006 ; Plourde and Cunnane, 2007 ; Laviaille and Layé, 2010 ; Calder, 2012). Le fait que les mêmes enzymes soient impliquées de façon compétitive dans la conversion des AGPI des séries *n*-6 et des *n*-3 rend l'influence de l'alimentation encore plus importante. Plusieurs équipes ont effectué des études quantitatives de ces conversions et ont montré de façon constante que l'ALA alimentaire est rapidement catabolisé et que seule une proportion minimale (moins de 0,1%) était convertie en DHA. Les rendements globaux de conversion seraient de 0,2% pour ALA \rightarrow EPA, de 0,13% pour EPA \rightarrow DPA et de 0,05% pour DPA \rightarrow DHA. Cette relative inefficacité indique que la biosynthèse des AGPI *n*-3 à longue chaîne (AGPI-LC)

à partir du précurseur est trop limitée pour satisfaire les besoins en DHA et autres AGPI-LC des tissus humains, ce qui conduit de nombreux auteurs à considérer le DHA lui-même comme un AG essentiel dont une proportion importante doit être apportée directement par l'alimentation (Pawlosky *et al.*, 2001 ; Williams and Burdge, 2006 ; Plourde and Cunnane, 2007 ; Lavalie and Layé, 2010).

3. Absorption, transport et distribution au cerveau

Comme pour les protéines, l'absorption des lipides est précédée d'une phase de digestion dépendante d'enzymes pancréatiques et de sels biliaires. Généralement, les AG d'origine alimentaire ne sont pas à l'état libre, mais se présentent sous forme d'esters plus ou moins complexes dont les TG sont les plus importants. Ces TG ne peuvent franchir les membranes cellulaires et doivent donc être hydrolysés en AG libres et en monoglycérides pour pouvoir être absorbés. Les enzymes responsables de cette hydrolyse sont des lipases dont l'action se déroule dans l'intestin grêle (Bazan *et al.*, 2011 ; Lambert and Parks, 2012). Une fois libérés, les AG à chaîne courte et moyenne peuvent, pour la plupart, rapidement traverser la barrière intestinale par diffusion passive, pour être déversés dans la circulation sanguine où ils sont associés à l'albumine pour accéder aux cellules. Les AGPI-LC quant à eux nécessitent leur incorporation dans des micelles mixtes qui facilite leur diffusion et leur réorganisation dans les entérocytes pour assurer leur transport. Dans ce processus, les AGPI-LC et les monoglycérides endocytés sont resynthétisés en TG dans le RE des entérocytes. Ils sont alors assemblés en lipoprotéines, puis libérés dans la circulation lymphatique sous forme de chylomicrons. Une fois sécrétées dans la voie lymphatique, les lipoprotéines rejoignent la voie sanguine par le canal lymphatique thoracique et distribuent leur contenu aux différents tissus périphériques (Merkel *et al.*, 2002 ; Shi and Burn, 2004 ; Burdge and Calder, 2005 ; Ginsberg *et al.*, 2006 ; Bazan *et al.*, 2011 ; Mitchell and Hatch, 2011).

La diffusion des AG vers le cerveau nécessite des étapes de transport et de transfert à travers la BHE. La BHE forme l'interface cellulaire entre le sang et l'environnement extracellulaire du SNC. Elle sert de barrière protectrice pour prévenir le passage de substances potentiellement cérébrotoxiques véhiculées par le sang. Elle se compose de trois types de cellules : les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux, les péricytes et les pieds des astrocytes. L'endothélium et les péricytes forment une membrane basale commune dont 99% de la surface interagit avec les astrocytes (Figure 22). La différence majeure entre les capillaires des tissus périphériques et ceux du cerveau est la présence de jonctions serrées complexes qui forcent les substances à se déplacer à travers les cellules par diffusion passive ou par l'intermédiaire de systèmes de transport spécifiques (Mitchell and Hatch, 2011).

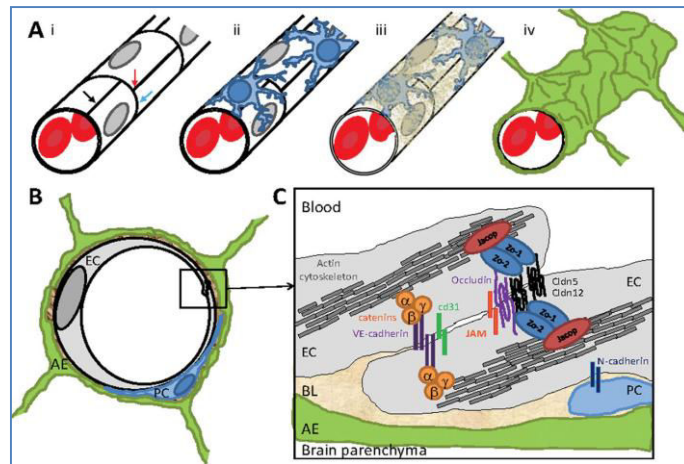


Figure 22 : Représentation schématique de la structure de la barrière hémato-encéphalique

(d'après Daneman, 2012)

(A) Représentation schématique de la BHE, formée de différents types cellulaires. (i) Les cellules endothéliales forment un tube permettant au sang de s'écouler au travers. Elles se replient sur elles-mêmes pour former des jonctions serrées intracellulaires (flèche noire) et adhèrent aux cellules endothéliales adjacentes par des jonctions serrées intercellulaires (flèche bleue). Le point où les jonctions intra- et intercellulaires se rencontrent forment une adhésion tricellulaire (flèche rouge). (ii) Les péricytes en bleu adhèrent à la surface des cellules endothéliales. (iii) Le tube vasculaire des cellules endothéliales et des péricytes est entouré par une couche de membrane basale constituée de protéines de la matrice extracellulaire sécrétée par les cellules vasculaires et nerveuses. (iv) Les pieds des astrocytes engainent les vaisseaux sanguins. (B) Représentation schématique transversale des principaux types cellulaires formant la BHE, tels que les cellules endothéliales (EC en gris), les péricytes (PC en bleu), la lame basale (BL en brun) et les pieds des astrocytes (AE en vert). (C) Représentation schématique des jonctions serrées des cellules endothéliales des capillaires du SNC. Ces jonctions sont formées par des protéines d'adhésion transmembranaires, notamment les claudines, occludines et les JAMs (Junctional Adhesion Molecules) qui sont liées au cytosquelette d'actine et par des jonctions cadhérine-caténine et des protéines adaptatrices comprenant ZO et Jacop.

Les mécanismes de transport des AG à travers les cellules de la BHE ont longtemps fait débat et restent encore assez mal connus. Des études suggèrent que les AG comme d'autres molécules hydrophobes peuvent traverser la bicouche lipidique par diffusion passive en utilisant un mécanisme flip-flop indépendant des protéines. Dans ce modèle, les AG sont dissociés de l'albumine et lient le feuillet externe de la membrane. Cette diffusion libre est là encore hautement dépendante de leurs caractéristiques lipophiles et de leur taille. Les AG à chaîne courte ou moyenne ont un haut coefficient de diffusion et traversent facilement la bicouche lipidique, alors que les mouvements transmembranaires des AG-LC sont souvent plus complexes. D'autres études ont avancé que ces AG entrent dans la cellule à l'aide de mécanismes de transport impliquant des protéines spécifiques. Leur passage serait donc facilité par la présence de transporteurs protéiques d'AG dont il existe plusieurs classes comme les FATP-1 à -6 (*Fatty Acid Transport Protein*), FAT/CD36 (*Fatty Acid Translocase/CD36*), les FABPpm-1 à -9 (*Fatty Acid Binding Protein plasma membrane*) ou la cavéoline-1 (Figure 23) (Mitchell *et al.*, 2011 ; Pélerin *et al.*, 2014).

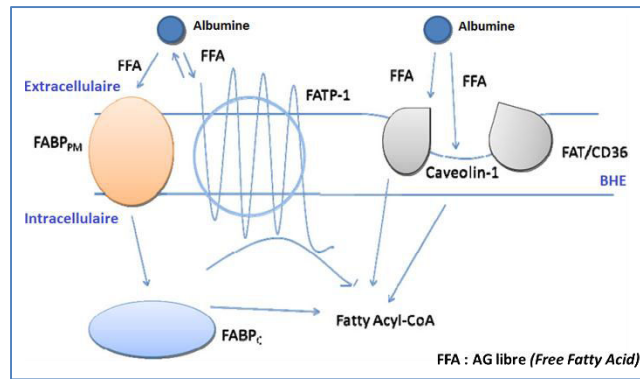


Figure 23 : Représentation schématique du transport des acides gras au travers de la BHE
(d'après Mitchell *et al.*, 2011)

4. La biodisponibilité des acides gras

La biodisponibilité est la proportion d'une substance qui va effectivement agir dans l'organisme par rapport à la quantité absorbée. Pour les AG, il s'agit de la quantité retrouvée dans les tissus, par exemple le cerveau, par rapport à la quantité ingérée dans l'alimentation. La biodisponibilité des AG peut être mesurée de deux façons. La première, dite à court-terme, est évaluée par la mesure de la concentration plasmatique de la substance administrée en une dose unique. Cette méthode est utile pour évaluer des paramètres comme la vitesse, l'étendue de l'absorption intestinale des AGPI-LC *n*-3 ou l'influence de facteurs tels que la composition du bol alimentaire ou la formulation. À l'inverse, elle n'est pas adaptée pour évaluer leur absorption dans leurs tissus cibles, en particulier dans le cerveau. Pour cela, la mesure des niveaux d'AGPI-LC *n*-3 dans les membranes érythrocytaires est un bien meilleur indicateur de la biodisponibilité, dite à long-terme, capable de renseigner si l'organisme reçoit une quantité suffisante d'AGPI-LC *n*-3 (Schuchardt and Hahn, 2013). Des études ont d'ailleurs montré que les teneurs en AGPI-LC *n*-3 dans les membranes érythrocytaires étaient corrélées avec celles de membranes d'autres tissus dont les membranes neuronales (Metcalf *et al.*, 2007 ; Tu *et al.*, 2013).

Ces mesures ont ainsi permis de mettre en évidence que la biodisponibilité des AG des lipides alimentaires est liée aux AG eux-mêmes. En effet, des essais cliniques ont exposé qu'une supplémentation alimentaire avec des doses croissantes d'ALA induit une accumulation des métabolites intermédiaires tels que l'EPA ou le DPA dans le plasma, sans pour autant modifier les teneurs en DHA (Burdge and Calder, 2005 ; Arterburn *et al.*, 2006 ; Brenna *et al.*, 2009 ; Lane *et al.*, 2014). Une étude montre également que les régimes riches en LA peuvent influencer le métabolisme des AGPI *n*-3 par concurrence de substrat et inhibition compétitive de la $\Delta 6$ désaturase. Cette compétition métabolique entre les voies de conversion pourrait réduire de près de 40% la transformation d'ALA en ses dérivés *n*-3 (Arterburn *et al.*, 2006 ; Brenna *et al.*, 2009). Finalement, le moyen le plus efficace pour augmenter les teneurs plasmatiques et membranaires d'un AGPI-LC *n*-3 particulier est de l'apporter spécifiquement et directement dans l'alimentation (Aid *et al.*, 2003 ; Arterburn *et al.*, 2006 ; Plourde and Cunnane, 2007). Une supplémentation en DHA par exemple, conduit à une augmentation dose-dépendante des concentrations plasmatiques de

ce dernier, saturables pour des doses supérieures ou égales à 2 g/j. L'apport de 4 g/j d'EPA augmente également de manière dose-dépendante sa concentration plasmatique mais sans effet sur le DHA. L'apport alimentaire en EPA ou en DHA permet aussi d'augmenter les concentrations d'AGPI-LC *n*-3 dans les autres tissus (Arterburn *et al.*, 2006).

D'autres études se sont penchées sur l'influence de nombreux facteurs sur la disponibilité des AG, tels que leurs propriétés physicochimiques (forme de liaison chimique), les effets de matrice (composition du bol alimentaire), la présence d'autres ingrédients alimentaires qui améliorent ou inhibent l'absorption, leur métabolisme après absorption, l'état de santé et les facteurs individuels (Burdge and Calder, 2005 ; Schuchardt and Hahn, 2013). Ainsi le mode de préparation alimentaire ou la prise concomitante d'autres aliments peuvent jouer sur la disponibilité des AGPI-LC *n*-3. À titre d'exemple, l'ALA sous forme émulsionnée favorise son absorption (Lane *et al.*, 2013) alors que la présence d'ions calcium dans le bol alimentaire, pouvant former un complexe avec un AG, diminue sa biodisponibilité (Schuchardt and Hahn, 2013). Une autre étude a montré que la teneur en matière grasse du repas favorise significativement la disponibilité des AGPI-LC *n*-3, allant jusqu'à une absorption 3 fois plus élevée (Lawson and Hughes, 1988 ; Schuchardt and Hahn, 2013).

La biodisponibilité des AG des lipides alimentaires est aussi liée à la nature du vecteur. En effet, les AGPI-LC *n*-3 peuvent être apportés sous forme de TG (AGPI-TG) dans les huiles de poisson naturelles et dans les huiles modifiées, de PL (AGPI-PL) ou d'esters éthyliques (EE, AGPI-EE), utilisés pour la fabrication de compléments alimentaires. L'influence de cette liaison chimique module leur biodisponibilité. Bien que les conditions expérimentales varient en termes de doses, de durée, de nombre de cas et de paramètres mesurés, la biodisponibilité des TG, en particulier des TG réestérifiés (rTG), est globalement meilleure que celle des EE (Reis *et al.*, 1990 ; Neubronner *et al.*, 2011 ; Schuchardt and Hahn, 2013). D'autres données montrent une biodisponibilité plus élevée de l'EPA et du DHA à partir des PL, avec une incorporation maximale mesurée dans les membranes érythrocytaires de 80% suite à l'absorption d'AGPI-PL, de 60% de rTG et de 58% d'EE (Schuchardt *et al.*, 2011 ; Ulven *et al.*, 2011). L'explication de ces différences tient aux types de liaisons chimiques qui interfèrent sur l'efficacité de la digestion. Des études *in vitro* ont montré que les lipases pancréatiques hydrolysent les liaisons éthanol-AG de l'EE de manière 10 à 50 fois moins efficace que les liaisons glycérol-AG du TG, ce qui réduit l'absorption des EE (Yang *et al.*, 1990, 2009 ; Schuchardt and Hahn, 2013). Les PL, quant à eux, sont amphiphiles et ont donc des propriétés d'émulsion qui pourraient modifier la structure de la surface des gouttelettes d'huile de manière à faciliter l'accès des lipases pancréatiques à leurs substrats (Mun *et al.*, 2007). Enfin, certaines études cinétiques ont trouvé que les AG libres présentent une meilleure biodisponibilité que ceux sous forme de TG ou d'EE, mais ils sont très sensibles à l'oxydation et par conséquent, ils sont en général rapidement dégradés (el Boustani *et al.*, 1987 ; Lawson and Hughes, 1988 ; Davidson *et al.*, 2012).

Le métabolisme des AG essentiels est primordial pour leur apport au cerveau et dépend de leur disponibilité dans l'alimentation. Des déficits d'apports en EPA et en DHA peuvent exercer des effets

négatifs sur la santé. En revanche, la consommation d'aliments enrichis paraît le moyen le plus simple pour lutter contre les carences et permettre un apport direct et spécifique de ces AGPI au tissu cible. Au niveau cérébral, une étude chez le rat a montré que l'incorporation de DHA dans le cerveau équivaut à son taux de consommation métabolique cérébrale (Rapoport *et al.*, 2011). Or, le cerveau adulte semble relativement bien protégé, car une carence alimentaire en AGPI *n-3* de 15 semaines ne modifie quasiment pas sa teneur membranaire en DHA, alors que celle-ci est considérablement réduite dans le plasma, le foie et le tissu adipeux. Cette particularité du cerveau peut s'expliquer d'une part, par le fait que les AGPI stockés dans le foie et le tissu adipeux sont préférentiellement dirigés vers le cerveau, et d'autre part, par le fait que le renouvellement interne du DHA dans les membranes neuronales est très ralenti chez les animaux soumis à une carence alimentaire (DeMar *et al.*, 2004). En effet, la demi-vie du DHA dans les PL membranaires de la rétine a été estimée à 19 jours en conditions normales, mais elle est prolongée d'au moins 1.000 jours chez les rats soumis à une privation d'AGPI *n-3* après le sevrage (Stinson *et al.*, 1991). Toujours selon ce mode opératoire, la privation de DHA réduit de 89% sa concentration dans le plasma et de 37% dans le cerveau. Chez les rats soumis à un régime adéquat en AGPI *n-3*, la demi-vie moyenne du DHA est de 34 jours dans les PL cérébraux (58 j dans les PS, 32 j dans les PE, 24 j dans les PI et 23 j dans les PC). Chez les rats privés d'AGPI *n-3*, ces demi-vies sont accrues d'au moins 2 fois (DeMar *et al.*, 2004). En conclusion, dans le cerveau adulte, des mécanismes compensatoires existent pour minimiser la perte métabolique de DHA et faire face de manière efficace à la réduction de la disponibilité de l'AGPI.

C. Effets cérébraux des AGPI

Au-delà de leur rôle énergétique, les AGPI jouent un rôle essentiel en s'incorporant dans les membranes cellulaires, notamment cérébrales, dans lesquelles leur haut degré d'insaturation influe sur la fluidité membranaire. Les AGPI sont aussi des précurseurs de médiateurs impliqués entre autres dans l'inflammation et ils participent à la régulation génique *via* des facteurs de transcription comme PPAR et SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*) (Legrand, 2007). Si les carences en AG essentiels sont rares, les déficits, notamment *in utero* et chez les nouveau-nés, peuvent altérer le développement et le niveau des fonctions cognitives et des capacités visuelles de l'enfant. Plus tard au cours de la vie, ces déficits réduisent logiquement la réserve cérébrale, accentuant en conséquence le risque de développer une maladie neurodégénérative lors du vieillissement (Lavialle and Layé, 2010).

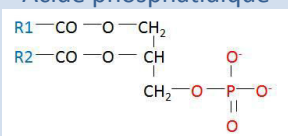
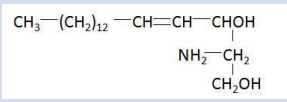
1. Rôle dans la composition des membranes cérébrales

Les AG sont les principaux composants des différentes classes de lipides représentées à 95% par les TG et à 5% par les PL, les esters de cholestérol et les vitamines liposolubles assimilées aux lipides en raison de leur insolubilité dans l'eau. Les PL se divisent en deux catégories : les glycérophospholipides (GPL) et les sphingophospholipides (SPL). L'acide phosphatidique, constitué de glycérol, de deux AG et d'un acide

phosphorique, est l'élément de base des GPL. L'acide phosphorique peut lier un alcool, aminé (choline, éthanolamine) ou non (sérine, inositol), dont la nature détermine la classe de GPL (phosphatidylcholine PC, phosphatidyléthanolamine PE, phosphatidylsérine PS ou phosphatidylinositol PI) (Tableau VII). Les SPL sont eux, 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. Là encore, la liaison formée détermine le type de SPL (Tableau VII) (Pulfer and Murphy, 2003 ; Hein *et al.*, 2009 ; Lerno *et al.*, 2010).

Tableau VII : Composition des glycérophospholipides et des sphingophospholipides

(d'après Pulfer and Murphy, 2003; Hein *et al.*, 2009; Lerno *et al.*, 2010)

	Glycérophospholipides	Sphingophospholipides
Éléments de base	<p>Acide phosphatidique</p>  <p>AG+ Glycérol + Acide phosphorique</p>	<p>Sphingosine</p> 
Liaison :	Choline : Phosphatidylcholine	AG seul : Céramide
Nom usuel	Éthanolamine : Phosphatidyléthanolamine	Céramide + phosphorylcholine : Sphingomyéline
	Sérine : Phosphatidylsérine	Céramide + βD-galactose ou βD-glucose : Cérébrogalactoside ou cérébroglucide
	Inositol : Phosphatidylinositol	Céramide + chaîne de plusieurs oses : Ganglioside

Le ganglioside est obtenu à partir de la céramide qui est un sphingophospholipides. Cependant, le ganglioside en lui-même appartient plutôt à la classe des sphingoglycolipides.

Dans le cerveau, les sphingomyélines (SM) représentent les composants majeurs des gaines de myéline des axones. Les gangliosides, quant à eux, ont initialement été isolés à partir de cellules ganglionnaires de cerveau, et pourraient jouer un rôle primordial dans le métabolisme neuronal puisqu'il s'agit de constituants abondants des membranes du SNC, représentant jusqu'à 10% du contenu lipidique des neurones. Dans la membrane, ils se projettent dans le milieu extracellulaire pour constituer des points d'ancrage pour d'autres molécules ou des analogues de récepteurs aux hormones, aux facteurs de croissance et autres ligands. Ils jouent un rôle dans les interactions intercellulaires, la différenciation ainsi que l'adhésion, et pourraient également avoir des effets neuroprotecteurs, en particulier GM1, capable de moduler la plasticité synaptique des neurones et de contribuer à régénérer les cellules neuronales soumises à différentes neurotoxines (Mocchetti, 2005).

Les GPL les plus abondants sont les PC qui représentent 42 à 44% des GPL cérébraux. Les autres classes majeures sont dans l'ordre d'importance, la PE (36 à 40%), la PS (11 à 13%) et le PI (2 à 3%). Les cellules peuvent synthétiser plus de 100 GPL qui diffèrent par leurs AG. Les AG sur le C1 (*sn-1*) du squelette glycérol sont majoritairement saturés, alors qu'ils sont insaturés sur le C2 (*sn-2*) (Sastry, 1985 ; Sprong *et al.*, 2001). Les perturbations du métabolisme phospholipidique jouent donc un rôle clé lors des

phénomènes apoptotiques en conduisant d'une part, à des dommages membranaires et d'autre part, à la génération de molécules bioactives issues notamment du métabolisme des AG libérés. Le DHA est l'AG le plus long et le plus insaturé des systèmes biologiques communs. Il est connu pour s'incorporer facilement dans les PL membranaires où il s'accumule en position *sn-2*. Il est d'ailleurs prédominant dans les membranes synaptiques et dans les cellules rétinienne. Il s'assemble préférentiellement dans les PE où il représente environ 25% des AG totaux du cortex, 30% de la rétine et 60% des cellules photoréceptrices (Guesnet and Alessandri, 2011).

Les fonctions physiologiques de la membrane sont hautement dépendantes de sa structure et de nombreux facteurs peuvent influencés la fluidité membranaire dont un des principaux est la composition lipidique. Les PL de la membrane contenant des AGPI constituent ces zones de fluidité. Ainsi, l'indice de fluidité des membranes peut être régulé par les neurones dans de nombreux cas comme la désaturation des AG, le transfert d'AG entre molécules et PL, la production de plus d'AGPI et le changement de la longueur de la queue de ces AG (Yehuda *et al.*, 2002 ; Langelier *et al.*, 2010). La composition en AG des PL membranaires dicte les propriétés physico-chimiques de la membrane et, par conséquent, l'environnement dans lequel évoluent et interagissent les protéines associées (Stillwell and Wassall, 2003 ; Lavalie and Layé, 2010). La teneur en DHA est particulièrement enrichie dans les PL membranaires du cerveau et ce dernier aurait donc un impact sur la fluidité des membranes de par sa structure moléculaire dynamique et sa conformation dans l'espace. Il pourrait ainsi affecter localement la fluidité des membranes en s'incorporant dans les PL (Feller *et al.*, 2002 ; Stillwell and Wassall, 2003). Ces changements de fluidité pourraient avoir une conséquence directe sur les protéines enchâssées dans la membrane. Ces différents aspects seront développés ultérieurement dans un paragraphe consacré aux membranes.

2. Rôle dans la neurotransmission

Après le tissu adipeux, le SNC possède la plus forte concentration de lipides, soit 30 à 50% du poids sec du cerveau adulte. Les AGPI-LC en représentent 20 à 25%, dont les principaux sont l'ARA et le DHA qui sont les composants fondamentaux des PL membranaires des cellules nerveuses (Hadders-Algra, 2011). Au niveau subcellulaire, les taux les plus élevés de DHA se trouvent dans les membranes synaptiques, lieu de transmission chimique interneuronale de l'onde de dépolarisation correspondant au message nerveux. Ceci suggère des fonctions particulières et importantes du DHA dans le SNC. Les concentrations membranaires des AGPI-LC *n-6* et *n-3* dépendent de l'apport alimentaire et l'équilibre entre ARA et DHA est un déterminant majeur des processus d'acquisition, de maturation et de maintien des fonctions cérébrales (Lavalie *et al.*, 2007 ; Lavalie and Layé, 2010 ; Astarita and Piomelli, 2011 ; Denis *et al.*, 2013).

Le cerveau adulte jouit d'une grande plasticité et subit des remaniements permanents qui se traduisent par la réorganisation des réseaux neuronaux, impliquant la projection ou la rétraction de prolongements et la mise en place de nouvelles connexions (Lavalie and Layé, 2010). Ce renouvellement neuronal a notamment été décrit dans l'hippocampe de rat adulte, chez qui un régime riche en DHA

entraîne une augmentation de la neurogenèse, de la croissance neuritique (Kawakita *et al.*, 2006) et de la synaptogenèse (Oksman *et al.*, 2006). À l'inverse, dans la même structure, la taille des neurones est réduite par une carence alimentaire en AGPI *n-3* (Ahmad *et al.*, 2002) et cette carence aggrave l'altération de la neurotransmission glutamatergique associée au vieillissement (Latour *et al.*, 2013)

La modification de la teneur membranaire en DHA a une incidence directe sur les structures riches en neurotransmetteurs. De nombreuses études chez les rongeurs ont montré qu'une carence en AGPI *n-3* affecte plusieurs paramètres de la neurotransmission comme le pool vésiculaire des neurotransmetteurs et les niveaux de récepteurs cérébraux dans certaines régions du cerveau (Lavialle and Layé, 2010). Les données expérimentales accumulées au cours des dernières années fournissent de précieux indices sur le rôle des AGPI *n-3* dans la régulation des synapses glutamatergiques responsables de la mémoire et de sa persistance au cours du vieillissement. Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur cérébral et les synapses glutamatergiques sont particulièrement abondantes dans l'hippocampe (Denis *et al.*, 2013; Latour *et al.*, 2013). Une carence en AGPI *n-3* provoque la diminution de l'expression des sous-unités NR2A et NR2B du récepteur NMDA dans le cortex et l'hippocampe de souris (Calon *et al.*, 2005). À l'inverse, une supplémentation en AGPI *n-3* maintient l'expression des sous-unités des récepteurs du glutamate comme GluR2 et NR2B, qui a tendance à diminuer au cours du vieillissement (Dyall *et al.*, 2007). Mais le système glutamatergique n'est pas le seul à être impacté. Il a par exemple été observé qu'une carence en AGPI *n-3* chez le rat entraîne une diminution de 40 à 60% de la quantité de dopamine associée à une légère baisse de son récepteur D2 dans le cortex frontal alors qu'il est constaté une forte augmentation dans le *nucleus accumbens* (Delion *et al.*, 1994 ; Chalon, 2006). Suite à une stimulation pharmacologique, la libération de dopamine est réduite de 90% chez des rats carencés en AGPI *n-3*, ce qui peut s'expliquer par une déficience des transporteurs vésiculaires (Zimmer *et al.*, 2000). Inversement, des rats dont les membranes cérébrales sont riches en DHA et pauvres en ARA suite à un régime supplémenté en huile de poisson montrent une augmentation de 40% des niveaux de dopamine endogène et de récepteurs D2 dans le cortex frontal, avec cette fois-ci une diminution dans le striatum (Chalon *et al.*, 1998). Le déficit en AGPI *n-3* influe également sur les niveaux des récepteurs 5-HT2 de la sérotonine qui sont augmentés dans le cortex frontal sans différence de concentration de la sérotonine endogène (Delion *et al.*, 1994). Là encore, après stimulation, les taux de sérotonine libérée sont réduits (Kodas *et al.*, 2004). La carence en AGPI *n-3* entraîne une diminution drastique, près de 70%, de la teneur en DHA dans les PL des membranes cérébrales, ce qui modifie aussi la voie cholinergique dans l'hippocampe, avec une augmentation de la libération d'ACh en conditions basales et une diminution sous stimulation. La privation en AGPI *n-3* entraîne une réduction de 10% des récepteurs muscariniques, sans changement de son transporteur vésiculaire (Aïd *et al.*, 2003). Tous ces résultats suggèrent que la consommation chronique ou à long terme d'un régime déficient ou déséquilibré en AGPI *n-3* modifie l'activité des neurotransmetteurs, notamment ceux impliqués dans la modulation de l'attention, de la motivation, de l'émotion, de l'apprentissage et des performances mnésiques, ce qui peut induire des troubles du comportement ou un déclin cognitif au cours du

vieillessement (Delion *et al.*, 1994 ; Aïd *et al.*, 2003 ; Chalon, 2006 ; Lavialle *et al.*, 2007). La plasticité des synapses est soutenue par l'action concertée de trois partenaires cellulaires : les compartiments neuronaux pré- et postsynaptiques, et les astrocytes environnants. L'homéostasie de l'environnement synaptique assure une régulation fine de la neurotransmission. La rupture de cette régulation comme celle mise en évidence en conséquence d'une carence en AGPI *n-3* est une étape d'initiation et/ou de propagation des lésions cérébrales liées au vieillissement et conduisant à un déclin cognitif (Denis *et al.*, 2013).

3. Rôle de messenger

Les AGPI peuvent être libérés des PL membranaires par hydrolyse sous l'action de la phospholipase A₂ (PLA₂) (Denis *et al.*, 2013) pour libérer l'ARA, l'EPA ou le DHA et les lysophospholipides (LPC). Appartenant à la famille composée de près de 30 phospholipases A, la PLA₂ cytosolique dépendante du calcium Ca²⁺ (cPLA₂) est responsable de la libération de l'ARA. Les enzymes PLA₂ indépendante du Ca²⁺ (iPLA₂) et sécrétée (sPLA₂) participent aussi à la libération des AGPI et des LPC, mais de manière spécifique de la cellule et du stimulus (Murakami, 2011; Cheon *et al.*, 2012). Ces formes ont toutes été identifiées dans les neurones et les astrocytes. La cPLA₂ est localisée dans les membranes neuronales postsynaptiques. Elle requiert un faible niveau de calcium pour se localiser à la membrane et elle est activée par phosphorylation notamment par la kinase ERK_{1/2}, pour libérer sélectivement l'ARA. La sPLA₂ est localisée dans les vésicules présynaptiques libérées par exocytose lors de la dépolarisation de la membrane et requiert de fortes concentrations de Ca²⁺ pour son activation et la libération d'ARA et de DHA (Basselin *et al.*, 2012). La majorité des AGPI *n-6* et *n-3* libérés des PL membranaires synaptiques est réincorporée dans les PL cérébraux, mais une petite partie entre dans des voies métaboliques et donnent naissance à des composés bioactifs (Figure 24) (Lavialle and Layé, 2010 ; Basselin *et al.*, 2012 ; Lagarde *et al.*, 2013).

L'ARA est le précurseur d'une famille de molécules régulatrices, les eicosanoïdes, qui exercent leurs effets localement de façon autocrine ou paracrine. Les eicosanoïdes comprennent les prostanoïdes (prostaglandines PG, thromboxanes THX et les leucotriènes LT), produits respectivement par les cyclooxygénases (COX) et les lipoxygénases (LOX) (Murakami, 2011 ; Lagarde *et al.*, 2013). Les prostanoïdes de la série 2 (PGE₂, PGH₂, PGD₂) et les leucotriènes de la série 4 (LTA₄, LTC₄, LTB₄) jouent des rôles importants dans les fonctions neuronales incluant l'excitabilité des membranes, l'apoptose ou la plasticité synaptique, et portent des activités pro- ou anti-inflammatoires (Murakami, 2011 ; Basselin *et al.*, 2012). L'EPA n'est pas un compétiteur fort de l'ARA et n'est qu'un précurseur mineur de certains eicosanoïdes parmi lesquels les PG3 et les LT5 qui présentent un rôle de régulation du processus inflammatoire (Mingam *et al.*, 2008 ; Lavialle and Layé, 2010). Par contre, cet AG est à l'origine d'une famille de molécules bioactives capables d'intervenir dans la résolution des processus inflammatoires, les résolvines. Ces résolvines sont capables de bloquer la production de cytokines pro-inflammatoires (Serhan *et al.*, 2008). Enfin, la conversion enzymatique du DHA en docosatriènes, famille de molécules bioactives, nécessite une oxygénation sélective par la 15-lipoxygénase-1 (15-LOX-1). Parmi ces dérivés, les membres les plus actifs sont la

neuroprotective D1 (NPD1) et les résolvines (Legrand, 2007 ; Bazan *et al.*, 2011). NPD1 induit une signalisation favorisant la survie en régulant à la hausse les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2) et à la baisse les protéines proapoptotiques (Bax, Bad) en réponse au stress oxydant (Bazan *et al.*, 2011). Le DHA et ses métabolites ont un potentiel anti-inflammatoire, antioxydant et anti-apoptotique. Ils permettent en particulier de diminuer l'activité COX2 et de bloquer la production des cytokines par les cellules gliales et l'activation de NF- κ B induite par l'IL-1 β (Figure 24) (Basselin *et al.*, 2012).

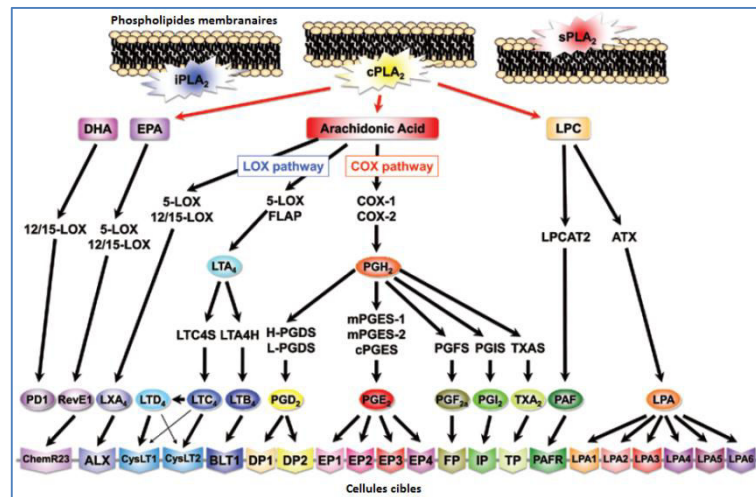


Figure 24: Voie des médiateurs lipidiques

(d'après Murakami, 2011)

Dans la voie COX, l'ARA est converti en PGH₂ par COX1 et COX2 et ensuite en prostanoides bioactif (PGD₂, PGE₂, PGF₂ α , PGI₂ et TXA₂) par diverses PG synthases terminales comme les PGD synthases de type hématopoïétique et lipocaline (H- et L-PGDS), les PGE synthases cytosolique liant la membrane (cPGE, mPGES-1 et mPGES-2) et les PGF, PGI et TX synthases. Dans la voie 5-LOX, l'ARA est converti en LTA₄ par 5-LOX et FLAP puis en leucotriène bioactif par l'hydrolase LTA₄ (LTA₄H) ou la LTC₄ synthase (LTC₄S). L'ARA, l'EPA et le DHA sont, quant à eux, convertis par 5-LOX et 12-LOX en médiateurs lipidiques anti-inflammatoires tels que la lipoxine A₄ (LXA₄), les résolvines E₁ (RevE₁) et les protectines D₁ (PD₁). Les LPC sont convertis en PAF par LPCAT2 ou en LPA par l'autotaxine.

Certains auteurs avancent que les métabolites bioactifs issus de ces AGPI *n*-3 seraient à l'origine des effets bénéfiques sur la santé observés dans les études de supplémentation nutritionnelle de patients en AGPI *n*-3. Un apport en AGPI influence le profil des molécules de signalisation lipidique générées par l'axe PLA₂/COX, aussi bien en termes de concentrations qu'en termes d'isoformes. L'activation de l'axe PLA₂/COX dans les membranes de cellules cérébrales (neurones, astrocytes, microgliales) est l'élément clé de réponse du cerveau aux dérégulations de l'homéostasie menant à l'activation gliale et aux processus neuro-inflammatoires qui contribuent au vieillissement cérébral. Les cascades de signalisation lipidique sont complexes, souvent redondantes, très fortement interconnectées et contre-régulées dans de nombreux cas. Les enzymes et récepteurs impliqués dans la médiation lipidique sont donc des cibles pharmacologiques pour de nombreuses pathologies (Murakami, 2011 ; Denis *et al.*, 2013).

L'implication des AG libres dans la régulation de la transcription de gènes a d'ailleurs été décrite dans les années 1960 avec l'étude des effets des AG sur les gènes de la lipogenèse dans le foie et le tissu adipeux (Allmann and Gibson, 1965). Depuis, d'autres études ont montré que cette régulation transcriptionnelle des taux d'AG s'exerçait aussi dans d'autres organes et notamment dans le cerveau

(Kitajka *et al.*, 2002 ; Hajjar *et al.*, 2012 ; Harbeby *et al.*, 2012). Les AGPI peuvent affecter l'expression de gènes par le biais de divers mécanismes incluant les changements de composition de la membrane et la production d'eicosanoïdes, mais leurs différents métabolites peuvent aussi agir au niveau transcriptionnel. Plusieurs de ces médiateurs de transcription ont été identifiés et comprennent les récepteurs RAR et RXR des rétinoïdes, les récepteurs PPAR et le récepteur hépatique nucléaire LXR, la protéine SREBP se fixant à l'élément de réponse aux stéroïdes, le facteur nucléaire hépatique HNF-4 α et les facteurs NF- κ B et I- κ B (Jump, 2002 ; Sampath and Ntambi, 2005 ; Legrand, 2007 ; Bazan *et al.*, 2011).

4. Rôles dans le cerveau vieillissant

Les AGPI *n*-3 participent au maintien des fonctions cognitives chez le sujet âgé. Le vieillissement altère de nombreux processus neurobiologiques évoqués précédemment, en particulier la plasticité cérébrale, l'activité synaptique, le métabolisme des neurotransmetteurs et la neurogenèse. Tant que le cerveau s'adapte à ces modifications, les dysfonctionnements structurels ne s'accompagnent pas d'altérations fonctionnelles (Astarita and Piomelli, 2011). La composition cérébrale en AGPI est modifiée au cours du vieillissement, et plus singulièrement la teneur en DHA qui diminue progressivement avec l'âge en dépit de la disponibilité des AGPI *n*-3 dans l'alimentation (Favrelère *et al.*, 2000 ; Ulmann *et al.*, 2001 ; Burdge *et al.*, 2003 ; Burdge and Calder, 2005 ; McNamara *et al.*, 2008 ; Yetimlier *et al.*, 2012). En effet, une diminution des niveaux de LA, d'ARA et de DHA a été observée dans l'hypothalamus de la souris (Yetimlier *et al.*, 2012). De même, une diminution des AGPI *n*-6 et *n*-3 totaux a été mesurée dans les PL de l'hippocampe et du cortex frontal du rat (Favrelère *et al.*, 2000 ; Ulmann *et al.*, 2001). Chez l'homme entre 29 et 80 ans, l'avancée en âge est associée à une diminution progressive de la composition en AGPI du cortex frontal, notamment en DHA et en ARA, inversement corrélée à l'expression et à l'activité de la stéaroyl-CoA désaturase, qui entraîne une augmentation des AGMI en dépit de l'augmentation compensatoire de l'expression génique des élongases et des Δ 5- et Δ 6-désaturases (McNamara *et al.*, 2008). Toutes ces modifications sont associées à un défaut de transmission synaptique, une libération réduite de neurotransmetteurs comme le glutamate, et une perte des capacités d'apprentissage et des déficits cognitifs (Ulmann *et al.*, 2001 ; Yetimlier *et al.*, 2012). En revanche, de nombreuses études ont montré qu'une supplémentation alimentaire en AGPI *n*-3 et plus particulièrement en DHA peut être bénéfique pour lutter contre le vieillissement et les troubles cognitifs associés et se révèle intéressante dans les troubles psychiatriques, cognitifs et neurodégénératifs (Plourde and Cunnane, 2007 ; Yurko-Mauro *et al.*, 2010).

En résumé, le cerveau est, après le tissu adipeux, l'organe contenant la plus grande proportion de lipides, ce qui suggère une implication importante du statut et du métabolisme lipidique dans le fonctionnement cérébral et le maintien des fonctions cognitives. Les AGPI présents dans notre alimentation, de par leur nature et leur quantité, influencent la santé de l'homme et sont nécessaires au

fonctionnement optimal du cerveau. Des études cliniques ont mis en évidence qu'une carence alimentaire en AGPI *n-3* et plus particulièrement en DHA, était associée à des troubles cognitifs et comportementaux durant le développement et au cours du vieillissement. Ces AGPI servent, dans le cerveau, à satisfaire non seulement une partie de nos dépenses énergétiques mais en tant que précurseurs de médiateurs lipidiques, interviennent dans de nombreux processus de régulation dont l'inflammation. Ils jouent également le rôle de ligands de récepteurs nucléaires et participent ainsi à la régulation de nombreux gènes impliqués notamment dans le métabolisme lipidique. Enfin, en tant que constituants fondamentaux des membranes, les lipides et plus particulièrement les AGPI, sont susceptibles de moduler les propriétés physico-chimiques membranaires et donc de jouer un rôle sur les protéines qui y sont enchâssées. La perturbation de la composition membranaire pourrait être une source de dysfonctionnement cérébral au niveau métabolique, physiologique et comportemental et à terme entraîner une pathologie de type MA. Une supplémentation en DHA pourrait pallier ces perturbations et permettre de maintenir une efficacité des fonctions cérébrales. C'est l'hypothèse que nous avons choisi de développer pour ce travail de thèse.

III. Les membranes, un compartiment actif à part entière

Longtemps considérées comme de simples barrières entre deux compartiments, les membranes sont maintenant étudiées comme un environnement dynamique pour les protéines qu'elles contiennent, et leurs changements de composition, qu'ils soient quantitatifs ou qualitatifs, jouent un véritable rôle régulateur sur ces protéines (Parmryd and Onfelt, 2013 ; Volinsky and Kinnunen, 2013).

La caractérisation biologique de l'entité « membrane » a largement évolué au cours du temps et il est aujourd'hui admis qu'elles constituent une mosaïque de domaines composée de régions fluides et de régions denses, les microdomaines membranaires, maintenues par le réseau du cytosquelette. La matrice lipidique des membranes peut ainsi exister selon trois phases : le gel, la phase l_o (liquide ordonnée) et la phase l_d (liquide désordonnée), de fluidité croissante (Brown and London, 2000). La nature des lipides membranaires qui la constitue a un rôle important dans la formation de ces domaines dont il existe plusieurs types. Alors que les membranes biologiques sont typiquement fluides ou dans un état liquide à température physiologique, des interactions combinatoires entre lipides spécifiques entraînent la formation de ces microdomaines, organisés en phase l_o denses, appelés radeaux lipidiques ou rafts (Pike, 2004 ; Mencarelli and Martinez-Martinez, 2013).

A. Les domaines rafts dans les membranes

C'est en 1997 que Simons et Ikonen apportent une base moléculaire au concept d'hétérogénéité latérale des membranes biologiques en présentant le modèle des rafts qui seraient formés grâce à l'association latérale des sphingolipides saturés à chaînes longues sur le feuillet externe, les espaces entre les chaînes des sphingolipides étant comblés par des molécules de cholestérol. Les rafts ont donc été présentés comme des plateformes lipidiques de composition chimique particulière qui fonctionnent en ségrégant des composants membranaires à l'intérieur de la membrane cellulaire (Simons and Ikonen, 1997). Les premières données supposaient que les rafts étaient relativement stables, mais il est vite apparu qu'ils devaient être extrêmement petits et très dynamiques (Pike, 2003). Ces petites unités très mobiles seraient capables de se regrouper dans des domaines plus stables pour être fonctionnelles (Maxfield and Wüstner, 2002). Les divergences concernant la description des rafts au cours des années démontrent cependant la difficulté à les caractériser structurellement. En 2006, une définition des rafts a été proposée et ils ont été décrits comme des domaines de petites tailles (10 à 200 nm), hétérogènes, très dynamiques, enrichis en stérols et sphingolipides, qui compartimentent des processus cellulaires. Ces petits rafts peuvent être, dans certaines conditions stabilisés pour former de plus grandes plateformes grâce à des interactions protéines-protéines et protéines-lipides (Pike, 2006).

1. Composition

Les rafts constituent des entités préformées dans la membrane des cellules au repos et sont présents dans différentes parties de la bicouche lipidique (Mencarelli and Martinez-Martinez, 2013). Ces microdomaines sont asymétriques et contiennent 30 à 50% de cholestérol, soit 3 à 5 fois plus que les autres régions membranaires (Prinetti *et al.*, 2000 ; Pike, 2003, 2004), et jusqu'à 70% des SM cellulaires (Prinetti *et al.*, 2000 ; Cremesti *et al.*, 2002). Leur feuillet externe est particulièrement riche en sphingoglycolipides. Ainsi, 10 à 15% des sphingolipides membranaires et 10 à 20% des glycolipides membranaires sont concentrés dans les rafts. Leur feuillet cytoplasmique est, quant à lui, riche en glycérolipides. Si la membrane plasmique est très riche en PL dont les PE et PC, moins de 30% des lipides des rafts sont de ce type (Prinetti *et al.*, 2000 ; Pike, 2003, 2004 ; Bennett and Tieleman, 2013). Les rafts sont également très riches en gangliosides, en particulier le GM1 qui y est presque exclusivement localisé (Cremesti *et al.*, 2002). Au sein de ces rafts, les chaînes hydrocarbonées des AG sont majoritairement saturées et en conformation étirée de façon à former, avec le cholestérol, une phase l_o moins fluide que la membrane plasmique environnante. La présence de protéines stabilisatrices et spécifiques des rafts, telles que les flotillines ou les cavéolines, est également nécessaire pour les maintenir dans une conformation stable (Figure 25) (Hanzal-Bayer and Hancock, 2007 ; Bennett and Tieleman, 2013 ; Mencarelli and Martinez-Martinez, 2013).

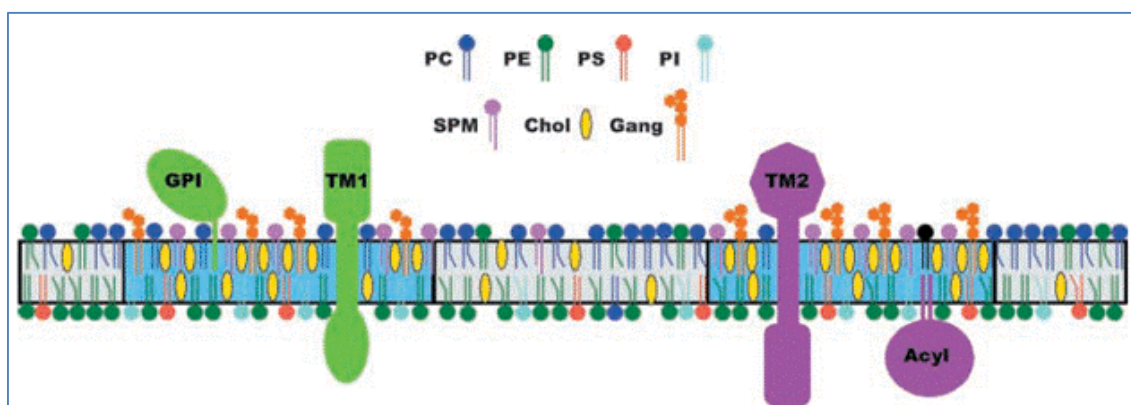


Figure 25 : Composition d'un raft

(d'après Pike, 2003)

Les rafts (bicouche en bleu) sont des domaines membranaires spécialisés contenant des concentrations élevées en cholestérol (Chol), sphingomyéline (SPM) et gangliosides (Gang). Au sein de ces rafts, les PL sont moins nombreux mais contiennent tous des chaînes d'AGS (lignes droites dans les queues lipidiques). Cette composition se traduit par une séparation de phase latérale et la génération d'un domaine liquide ordonné. La membrane plasmique environnante (bicouche en gris) contient moins de Chol, de SPM et de Gang, et plus de PL avec des chaînes d'AGI (lignes obliques dans les queues lipidiques). En conséquence, elle est plus fluide que les rafts. Dans les rafts, sont également présentes des protéines transmembranaires (TM), des protéines acylées (Acyl) ainsi que des protéines à ancre GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol).

2. Extraction et isolement

D'un point de vue physicochimique, les rafts sont caractérisés par leur insolubilité dans les détergents non-ioniques qui permet de les isoler du reste de la membrane (Pike, 2003, 2004). De nombreuses méthodes de préparation des rafts existent, employant un détergent particulier (Triton X-100, CHAPS, Lubrol WX, Brij 96, Brij 98, Nonidet P40, Tween 20, etc.) ou s'en affranchissant grâce à des

techniques de solubilisation de membranes par ultrasons ou lyse mécanique en milieu hypotonique (Pike, 2004 ; Wassall and Stillwell, 2009). Ces différentes méthodes d'extraction ont permis d'obtenir des fractions de compositions lipidiques et protéiques différentes, suggérant l'existence de plusieurs sous-populations de rafts. En effet, selon le détergent utilisé, des fractions membranaires plus ou moins enrichies en cholestérol et en sphingolipides sont obtenues. Par exemple, selon un modèle considérant une composition hétérogène des domaines coexistant dans les cellules, il est isolé des rafts « traditionnels », qui contiennent principalement du cholestérol et des sphingolipides, et qui sont très structurés et des rafts « atypiques », qui contiennent des niveaux plus faibles de cholestérol et de sphingolipides et des niveaux plus élevés de GPL, en particulier ceux qui ont des longues chaînes acyles saturées. Les différences de composition lipidique donnent lieu à une différence de sensibilité à l'extraction par les détergents. Les domaines contenant principalement du cholestérol et des sphingolipides sont résistants à une extraction par le Triton X-100, tandis que d'autres domaines qui contiennent de plus faibles concentrations sont solubilisés. Ce modèle prédit que les fractions isolées soient hétérogènes en composition puisque les domaines sont eux-mêmes hétérogènes (Pike, 2004). La composition des rafts semble donc dépendre fortement de la méthode d'extraction utilisée (Ahmed *et al.*, 1997). Il ne semble pas y avoir une structure facilement définie avec une composition lipidique uniforme. Ainsi, certaines études proposent que la solubilisation des membranes puisse remodeler des régions très différentes de celles réellement présentes *in vivo* après des fusions de microdomaines ou des échanges protéiques et lipidiques entre microdomaines (Mayor and Maxfield, 1995 ; Edidin, 2003).

3. Localisation

Le prérequis à la formation des rafts dans les membranes cellulaires est la présence de cholestérol et de sphingolipides en quantité suffisante. Or, il existe un gradient croissant de cholestérol du RE jusqu'à la membrane plasmique. Quant à la biosynthèse des sphingolipides, elle se déroule intégralement dans l'appareil de Golgi, suggérant donc que les rafts se forment dans ce compartiment intracellulaire avant d'être incorporés dans les vésicules pour être adressés à la membrane plasmique (Simons and Ikonen, 1997 ; Brown and London, 2000 ; Maxfield and Wüstner, 2002 ; Simons and Sampaio, 2011). Ainsi, bien que les rafts soient majoritairement localisés dans la membrane plasmique des cellules, ils ont aussi été identifiés dans d'autres organites tels que les endosomes, les cavéosomes et les phagosomes, organites connectés à l'appareil de Golgi et/ou à la membrane plasmique (Brown and London, 1997 ; Kokubo *et al.*, 2003 ; Morrow and Parton, 2005 ; Stuermer, 2011). Une fois intégrés à la membrane, les rafts subissent perpétuellement des phénomènes d'endo- et d'exocytose sous l'influence de certains paramètres tels que le taux de cholestérol. Preuve que ce dernier joue un rôle déterminant dans la formation et le renouvellement des rafts (Mukherjee and Maxfield, 2000). Il a ainsi été montré que la déplétion des cellules en cholestérol conduit à la rupture des rafts et à la diffusion de leurs constituants le long de la membrane

plasmique (Pike, 2004). Ces techniques de déplétion en cholestérol sont cependant drastiques et modélisent certainement mal la réalité *in vivo*.

4. Protéines spécifiques et fonctions cérébrales associées

Nous avons vu précédemment que les rafts sont stabilisés par des protéines spécifiques telles que la cavéoline-1 ou les flotillines-1 et -2. Au-delà de ce rôle stabilisateur, ces protéines leur confèrent des propriétés particulières (Cremesti *et al.*, 2002 ; Michel and Bakovic, 2007).

a. La cavéoline, les cavéoles et l'endocytose

Les premiers microdomaines membranaires mis en évidence et les seuls identifiables par leur morphologie et observables par microscopie sont les cavéoles (Figure 26). Les cavéoles sont des invaginations membranaires, de diamètre de 25 à 150 nm, présentes au niveau du réseau trans-golgien, des vésicules d'exocytose, du RE et de la membrane plasmique (Fujimoto *et al.*, 1998). En outre, les cavéoles peuvent fusionner pour former des structures en forme de grappes et de tubules avec des tailles beaucoup plus importantes que 100 nm. Morphologiquement, elles sont abondantes dans l'endothélium, les cellules musculaires, les adipocytes et les cellules épithéliales pulmonaires (Fujimoto *et al.*, 1998 ; Smart *et al.*, 1999 ; Head *et al.*, 2014). Des études ont également révélé que ces structures sont présentes au niveau du SNC (Cameron *et al.*, 1997; Ikezu *et al.*, 1998). Les cavéoles sont des structures riches en sphingolipides et cholestérol ainsi qu'en cavéoline et en cavine (Sargiacomo *et al.*, 1995 ; Pike, 2003, 2004 ; Stary *et al.*, 2012).

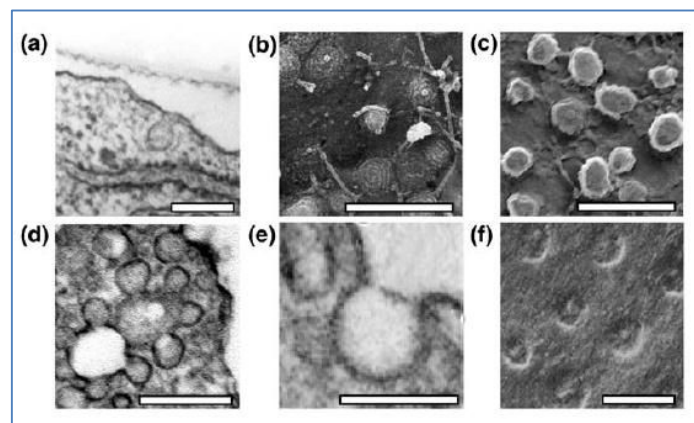


Figure 26 : Observation de cavéoles au microscope électronique

(d'après Hansen and Nichols, 2010)

Profil de cavéoles typiques à partir de cellules endothéliales de souris (a). Cavéoles striées détectées en microscopie électronique à balayage à la surface de membrane plasmique de fibroblastes (b). Cavéoles non striées détectées par microscopie électronique à balayage (c). Grappes de cavéoles ou cavéosomes de cellules différenciées adipocytaires NIH-L1 (d). a-d barre = 200 nm. Diaphragme cavéolaire, structure spécialisée composée de glycoprotéines transmembranaires PV1 et trouvée dans certaines cavéoles de cellules endothéliales (e). e-f barre = 100 nm.

Ces cavéoles sont notamment impliquées dans la transcytose de molécules dans les cellules endothéliales et dans l'endocytose de certaines toxines bactériennes (Simons and Ikonen, 1997). Dans des

cellules HeLa, cellules cancéreuses humaines du col de l'utérus, et dans des cellules rénales canines, il a été montré qu'à l'état basal, les cavéoles seraient des organites très peu dynamiques qui ne sont pas endocytés de manière constitutive mais qui représentent un compartiment stable de la membrane plasmique ancré par le cytosquelette d'actine (Thomsen *et al.*, 2002). En revanche, la présence de dynamine et de protéines de fusion du complexe SNARE dans les cavéoles indique qu'elles possèdent l'équipement protéique nécessaire pour se détacher de la membrane et fusionner avec les compartiments intracellulaires (Nabi and Le, 2003 ; Nichols, 2003 ; Kirkham and Parton, 2005). L'internalisation par les cavéoles peut d'ailleurs être induite par certains virus, des bactéries ou encore en réponse à l'agrégation des protéines glypiées (à ancre GPI) (Kurzchalia and Parton, 1999 ; Benmerah and Lamaze, 2002). Dans le cerveau, la nature restrictive de la BHE nécessite une machinerie cellulaire permettant de transférer et de délivrer des macromolécules au niveau cérébral. Ceci implique une transcytose dont les cavéoles seraient parmi les acteurs. En effet, elles endocytent notamment des récepteurs de la membrane plasmique et leur ligand spécifique tels que l'insuline, la transferrine ou des lipoprotéines (Preston *et al.*, 2014) et dans une proportion minime la leptine (Tu *et al.*, 2010).

b. La flotilline, les rafts, l'endocytose et la signalisation

Les cellules ne présentant pas morphologiquement de cavéoles identifiables possèdent néanmoins des domaines membranaires de faible densité et résistants aux détergents. Ces domaines rafts sont retrouvés dans la même fraction que les cavéoles à l'issue de nombreux procédés de fractionnement membranaire, car ils présentent des propriétés physiques très similaires (Pike *et al.*, 2002). Ils sont alors caractérisés par la présence de protéines spécifiques, les flotillines, qui pourraient représenter un analogue fonctionnel de la cavéoline dans les cellules n'en possédant pas (Morrow and Parton, 2005). Ces protéines ont initialement été décrites comme des protéines de la régénération axonale, régulée à la hausse après lésion du nerf optique du poisson rouge, et identifiée en tant que protéine Reggie. Elles existent sous deux isoformes très conservées, flotilline-1 et -2, ce qui suggère une fonction cellulaire importante (Neumann-Giesen *et al.*, 2004). Les flotillines s'insèrent au niveau de la membrane plasmique et dans les endomembranes, par l'ajout de modifications de type palmitoylation et myristoylation selon les isoformes (Rajendran *et al.*, 2003 ; Neumann-Giesen *et al.*, 2004). La flotilline-1 a été décrite pour s'associer aux compartiments membranaires des endocytos, des phagosomes, du Golgi et du noyau (Kokubo *et al.*, 2003 ; Morrow and Parton, 2005 ; Stuermer, 2011). Le domaine N-terminal de la flotilline-1 contient deux sites putatifs de liaison membranaire hydrophobes permettant son association tandis que l'extrémité C-terminale contient une région hélicoïdale α qui peut être impliquée dans l'oligomérisation ou les interactions protéines-protéines (Neumann-Giesen *et al.*, 2004 ; Morrow and Parton, 2005). Les régions N-terminales des deux protéines ont une homologie relativement élevée avec des régions respectives de la prohibitine et de la stomatine, protéines membranaires dont le rôle *in vivo* est encore relativement flou. Ce domaine porte le nom de SPFH (*Stomatin Prohibitin Flotillin Homology*) ou PHB (*Prohibit in Homology*)

(Neumann-Giesen *et al.*, 2004). Les rafts sont structurés et stabilisés par la formation d'homo- et d'hétéro-oligomères de flotilline qui se répartissent ponctuellement le long des membranes plasmiques (Stuermer *et al.*, 2001 ; Stuermer, 2011). Les flotillines sont exprimées de façon ubiquitaire et il a été signalé que la flotilline-1 est particulièrement présente au niveau du SNC, des tissus adipeux et musculaires et des érythrocytes (Morrow and Parton, 2005). Ces protéines peuvent être utilisées en tant que biomarqueurs des rafts (Stuermer, 2011). Elles ont ainsi permis de montrer que les rafts présentent des caractéristiques et des distributions différentes selon le type cellulaire et le stade de développement (Colombaioni and Garcia-Gil, 2004). Par exemple, dans les neurones matures, les rafts sont principalement accumulés dans les membranes des corps cellulaires et de l'axone postsynaptique (Stuermer *et al.*, 2001 ; Edidin, 2003). Les flotillines sont associées aux rafts mais colocalisent également avec des protéines glypiées dans les neurones (Stuermer *et al.*, 2001 ; Rajendran and Simons, 2005). Cette association avec des molécules de signalisation suggère un rôle dans la transduction du signal (Stuermer *et al.*, 2001 ; Pike, 2003 ; Neumann-Giesen *et al.*, 2004 ; Rajendran and Simons, 2005).

Grâce à leur faculté à concentrer ou à exclure des protéines particulières, les rafts peuvent favoriser des interactions entre certaines protéines, constituant de véritables plateformes de régulation des fonctions cellulaires. De plus, leurs propriétés physiques sont importantes pour garantir une conformation optimale des protéines, compatible avec leurs fonctions. Actuellement, les rafts sont considérés comme des éléments majeurs des processus d'endo- et d'exocytose et de transduction des signaux. L'utilisation de souris transgéniques n'exprimant pas la cavéoline-1 (CAV-1^{-/-}) a permis de mettre en évidence cette fonction, dans les fibroblastes embryonnaires issus de ces souris, une voie d'endocytose indépendante des puits de clathrine et de la cavéoline, mais relativement dépendante du cholestérol (Kirkham and Parton, 2005). En effet, la distribution hétérogène des lipides dans les rafts pourrait favoriser la formation de vésicules. Les différences de phase délimitant les régions l_o et l_d donnent naissance à une tension dans la membrane et cette énergie locale pourrait être en mesure de mener à la formation de vésicules (Hanzal-Bayer and Hancock, 2007). Ainsi, il a été montré que, dans des vésicules unilamellaires géantes, préparées à partir d'un mélange ternaire de dioléoylphosphatidylcholine, de SM et de cholestérol, la structure moléculaire du cholestérol pourrait déterminer sa capacité à induire d'une part, une séparation de phase et d'autre part, la courbure, positive ou négative, de la phase l_o formée. Cet effet du cholestérol pourrait avoir des implications dans divers processus cellulaires comme le bourgeonnement de vésicules ou l'endocytose (Bacia *et al.*, 2005). Les rafts ont notamment été impliqués dans des phénomènes d'endocytose du récepteur de l'interleukine-2 (IL-2) et de façon analogue, d'autres récepteurs transmembranaires peuvent être endocytés par les rafts comme le récepteur à haute affinité des IgE ou le récepteur de l'insuline (Lamaze *et al.* 2001 ; Benmerah and Lamaze 2002). Il est intéressant de noter que l'endocytose des récepteurs de l'IL-2 dépend de la dynamine, une propriété partagée avec les cavéoles et qu'à l'image des cavéoles, les rafts sont enrichis en molécules du signal et en protéines glypiées (Benmerah and Lamaze, 2002). Les vésicules issues des rafts et marquées par la flotilline semblent principalement

destinées à fusionner avec les endomembranes des organites ou à subir des processus de type transcytose (Brown and London, 2000 ; Nichols, 2003). Un rôle des rafts dans les processus d'exocytose a également été rapporté. En effet, des protéines du complexe SNARE, impliqué dans la fusion de vésicules synaptiques et la libération de neurotransmetteurs, comme les protéines syntaxines, SNAP-23, SNAP-25 et VAMP-2, sont concentrées, jusqu'à 25 fois pour certaines, dans les rafts (Chamberlain *et al.*, 2001 ; Hanzal-Bayer and Hancock, 2007). Cependant, le rôle des rafts reste controversé puisque des études suggèrent que la présence de ces protéines au sein des rafts soit nécessaire au phénomène d'exocytose pour permettre l'organisation structurelle et spatiale de la machinerie de sécrétion (Chamberlain *et al.*, 2001), alors que d'autres proposent que la séquestration de ces protéines inhibe la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique, donnant aux rafts la fonction de régulateurs de l'exocytose (Salaün *et al.*, 2005).

Ces rafts très structurés, dont l'architecture est déterminante pour le recrutement cohérent de protéines, régulent de nombreuses activités cellulaires telles que l'activation de récepteurs, la transduction de signaux et la fonctionnalité de voies de signalisation. C'est pourquoi les rafts sont parfois qualifiés de signalosomes. Il faut alors les considérer comme des plateformes permettant le recrutement ou l'association de récepteurs activés par la liaison de leur ligand (Sehgal *et al.*, 2002 ; Pike *et al.*, 2005 ; Sebastião *et al.*, 2013). Les protéines enrichies dans les rafts comprennent les composants des récepteurs à activité tyrosine-kinase (RTK), des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ainsi que d'autres récepteurs et protéines (Pike *et al.*, 2005). Dans un modèle simple, les rafts sont des plateformes de signalisation qui servent à colocaliser les composants nécessaires à la signalisation et à faciliter leurs interactions. La transduction du signal est alors rapide et efficace en raison de la proximité spatiale des composants, tous localisés dans un raft unique. Dans un modèle plus complexe, les composants ségrègent dans des rafts indépendants à l'état basal. La stimulation des cellules par des hormones ou des facteurs de croissance mène à la fusion transitoire de ces rafts et au rapprochement des composants. Un processus alternatif suggère que les rafts puissent contenir une voie de signalisation pratiquement complète qui serait activée après recrutement dans le raft d'un récepteur ou une autre molécule localisée normalement dans un domaine non-raft (Figure 27) (Mukherjee and Maxfield, 2000 ; Pike, 2003). Dans ces modèles, les rafts pourraient assurer la régulation de la signalisation par cloisonnement, ce qui implique qu'une perturbation des rafts provoque une dérégulation de certaines de ces voies. Cependant, le rôle des rafts pourraient encore être plus subtil si les protéines n'étaient pas entièrement localisées dans les rafts mais plutôt réparties entre les domaines rafts et non-rafts comme les RTK tels que le récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), à l'IGF ou au PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*) (Pike, 2003). Lors de l'activation par son ligand, le récepteur à l'EGF se déplacerait hors des rafts (Mineo *et al.*, 1999) tandis que le récepteur à l'IGF serait recruté dans les rafts en présence d'insuline (Vainio *et al.*, 2002) et que la localisation du récepteur au PDGF ne serait que très peu affectée par le NGF (*Nerve Growth Factor*) (Huang *et al.*, 1999). Même si les implications fonctionnelles des rafts sont parfois confuses, il a été montré dans tous les exemples de récepteurs, que l'épuisement ou la séquestration de cholestérol impacte la signalisation, ce

qui suggère que l'intégrité des rafts soit importante pour la transduction du signal (Sehgal *et al.*, 2002 ; Pike, 2003).

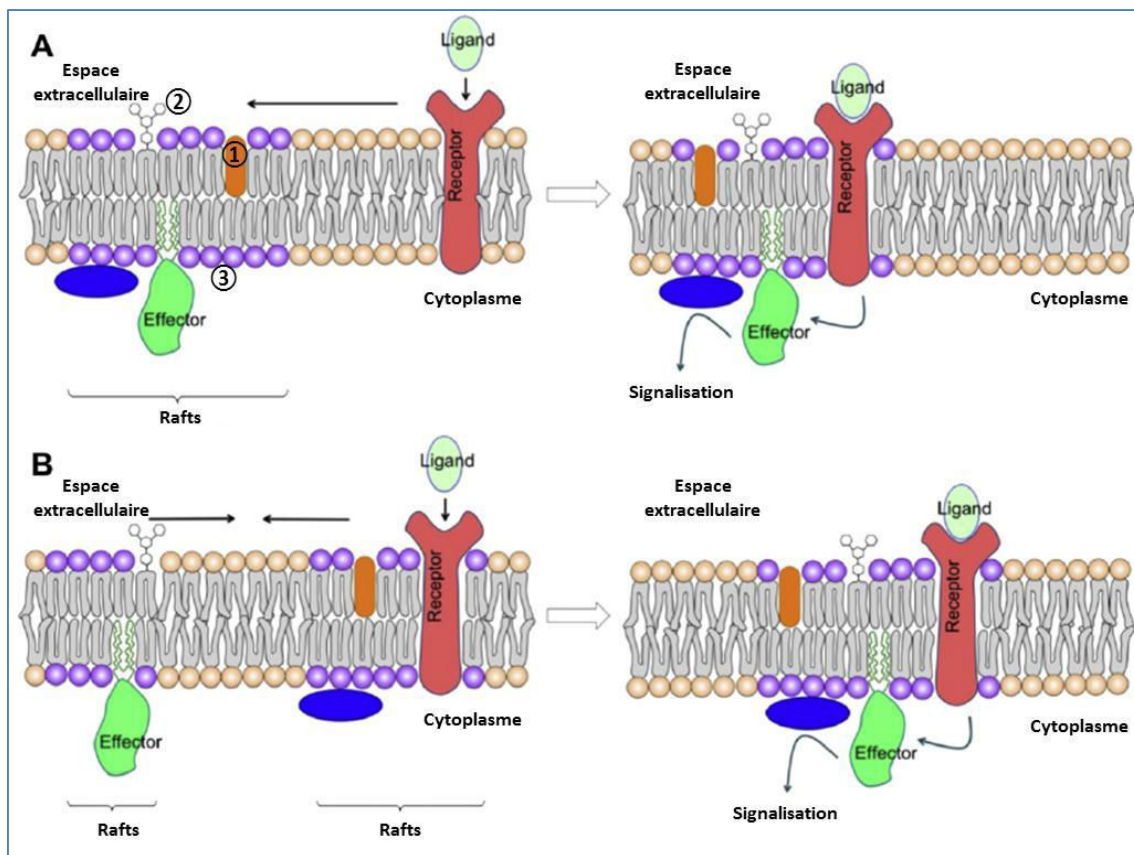


Figure 27 : Modèles illustrant le rôle des rafts sur l'activation de voies de signalisation

(d'après Sebastião *et al.*, 2013)

En A, un récepteur est localisé dans la région non-raft de la membrane plasmique et il est transporté vers des rafts lors de la liaison du ligand, où tous les composants nécessaires à l'activation de la voie de signalisation sont localisés. En B, tous les composants sont présents dans les rafts mais sont spatialement séparés. Lors de l'activation du récepteur, les rafts se regroupent permettant la propagation du signal. ① représente le cholestérol enrichi dans les rafts, ② représente les sphingoglycolipides, ③ représente les phospholipides à chaînes hydrocarbonées saturées. L'effeteur représente la protéine initiateur de la transduction du signal et en bleu est représentée une éventuelle protéine adaptatrice.

c. Rôle des rafts dans les neurones

Dans la signalisation synaptique, les rafts jouent également un rôle important comme en témoigne leur richesse en protéines synaptiques telle que les protéines SNAP (Chamberlain *et al.*, 2001 ; Hanzal-Bayer and Hancock, 2007) et PSD (Suzuki *et al.*, 2011). Il a par ailleurs été montré que les kinases BRSK-1 et -2 (*Brain Selective Kinase*), des sérine-thréonine kinases spécifiquement exprimées dans le cerveau et essentielles pour établir la polarité neuronale et pour réguler la libération de neurotransmetteurs synaptiques, ont une activité 3 fois supérieure lorsqu'elles sont associées aux rafts (Rodríguez-Asiain *et al.*, 2011). Dans des neurones hippocampiques et corticaux de rats en culture, il a été observé que les récepteurs AMPA colocalisent et s'associent aux rafts de la membrane et que cette association serait sous l'influence de l'activité des récepteur NMDA. En outre, la perturbation de la composition membranaire supprime de façon drastique l'exocytose du récepteur et son expression à la surface cellulaire, indiquant

un rôle important des rafts dans la disponibilité du récepteur AMPA (Hou *et al.*, 2008). Le fonctionnement cérébral, et en particulier neuronal, est aussi influencé par l'impact des rafts sur les transporteurs des neurotransmetteurs. Par exemple, les transporteurs de la choline sont concentrés dans les rafts des terminaisons nerveuses cholinergiques de la fente synaptique. Dans des cellules de neuroblastome SH-SY5Y et dans les terminaisons nerveuses de cerveau de souris, une diminution du cholestérol membranaire provoque une diminution significative de l'absorption de choline tandis que l'activité des transporteurs est augmentée par l'addition de cholestérol dans les membranes. Ainsi, les modifications de teneurs en cholestérol des membranes nerveuses auraient un impact sur la transmission cholinergique et la disponibilité de choline pour la synthèse d'ACh (Cuddy *et al.*, 2014). Une autre étude a montré des résultats similaires dans le cerveau de rat sur le transporteur de la sérotonine (SERT). L'association de SERT avec les rafts pourrait représenter un mécanisme de régulation de l'activité du transporteur et, par conséquent, sur la signalisation sérotoninergique dans le SNC, par l'intermédiaire de la modulation de la teneur en cholestérol dans le membrane cellulaire (Magnani *et al.*, 2004). Un autre exemple décrit que dans des synaptosomes de rats, l'activation de PKC par la norépinephrine est dépendante de la translocation dans les rafts du récepteur à la neurokinine 1 (NK1R) au contact des transporteurs de la norépinephrine suite à l'activation du récepteur. Ces transporteurs sont exprimés dans les rafts des terminaisons nerveuses noradrénergiques qui contrôlent la signalisation de la norépinephrine et la clairance des catécholamines. La localisation subcellulaire de ces transporteurs régulerait ainsi l'interaction avec NK1R, sa translocation dans les rafts et ainsi l'activation de la PKC (Arapulisamy *et al.*, 2013). Enfin, comme la cavéoline, la flotilline, protéine stabilisatrice des rafts, peut participer à la régulation de la transduction des signaux. Son implication dans la signalisation cellulaire met en jeu des interactions avec des protéines adaptatrices du cytosquelette d'actine et un domaine de recrutement reconnu par des protéines de signalisation cellulaire, comme décrit précédemment (Stuermer *et al.*, 2001 ; Pike, 2003 ; Neumann-Giesen *et al.*, 2004 ; Rajendran and Simons, 2005).

B. Les domaines non-rafts dans les membranes

Si nous avons clairement énoncé ci-dessus que la composition des rafts est primordiale à leur structuration, le reste de la membrane, composé principalement de PL contenant des AGPI constitue un environnement beaucoup plus désordonné qui influe lui aussi sur l'architecture et l'organisation des rafts. La modulation de la composition de ces domaines dits « non-rafts » contribue donc lui-aussi à créer un environnement plus ou moins fluide susceptibles de modifier les propriétés des rafts (Wassall and Stillwell, 2009).

1. Composition et propriétés

La composition en AG des PL de ces domaines non-rafts détermine ainsi les propriétés biophysiques des membranes cellulaires ainsi que la fonctionnalité des protéines et leur localisation (Langelier *et al.*, 2010). Les chaînes des AGPI majoritairement retrouvés dans ces régions ont un caractère très désordonné et adoptent des conformations spatiales complexes imposées par leur insaturation. La flexibilité de la chaîne résulte d'une interconversion rapide entre les états conformationnels, ce qui procure une surface de fluctuation rugueuse (Wassall and Stillwell, 2008). De nombreuses études de modélisation moléculaire ont été réalisées afin de connaître la conformation du DHA dans l'espace et donc son influence sur la structure membranaire. Basé sur des simulations en minimisation d'énergie, un modèle fait apparaître le DHA selon une structure dynamique pouvant adopter alternativement quatre conformations dans l'espace (Figure 28) (Feller *et al.*, 2002). Ainsi, les membranes riches en AGPI-LC se distordent en raison de l'encombrement stérique et de la réorientation rapide des chaînes hydrocarbonées, ce qui conduit à une transition d'une phase l_o à une phase l_d (Mitchell and Litman, 1998). Au vu de la complexité et de la variabilité des membranes biologiques, les conclusions restent délicates et controversées sur l'effet des AGPI sur la bicouche lipidique. Des données établissent toutefois qu'un enrichissement en DHA influe sur la fluidité, la perméabilité, la fusion et l'élasticité des membranes ainsi que sur le transport des protéines transmembranaires (Wassall and Stillwell, 2008).

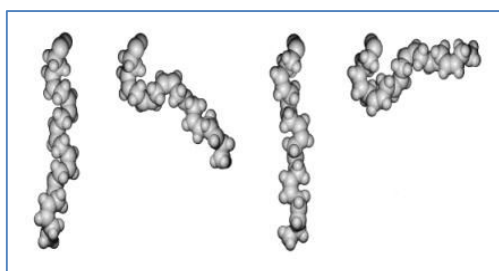


Figure 28 : Conformations du DHA dans l'espace selon une simulation de dynamique moléculaire

(d'après Feller *et al.*, 2002)

Les PL peuvent par ailleurs subir des processus rapides de déacylation et de réacylation impliquant la présence de PLA₂ et d'acyltransférases qui assurent les échanges permanents d'AG entre les différentes classes de PL (Farooqui *et al.*, 2000). Ce phénomène permet de préserver la membrane neuronale par le contrôle de l'équilibre entre AG libres et estérifiés. En effet, des niveaux élevés d'AG insaturés libres induisent une déstabilisation de la membrane cellulaire, un stress oxydant et éventuellement la mort cellulaire, alors que la réacylation de ces AG dans les PL membranaires restaure l'intégrité membranaire et assure la survie de la cellule (Farooqui *et al.*, 2004).

Au vu des données présentées ici, il apparaît donc que l'édifice membranaire n'est pas figé et les lipides comme les protéines ont de grandes libertés de mouvement. Les zones non-rafts enrichis en PL sont mobiles et peuvent se déplacer latéralement ou être animés de rotation. Cette diffusion latérale dans le

plan membranaire ou rotationnelle dans l'épaisseur de la membrane donne à la bicouche la fluidité d'un liquide ce qui a pour conséquence directe de permettre aux protéines de se déplacer latéralement dans la membrane.

2. Fonctions cérébrales associées aux zones fluides

Dans le cerveau, la membrane neuronale est un site fonctionnel essentiel pour de nombreux processus cellulaires tels que la conduction de l'information neuronale, la régulation d'enzymes, l'activité des canaux ioniques et des récepteurs. Sa composition lipidique et plus particulièrement sa teneur en AGPI *n-3* peuvent donc affecter directement le fonctionnement cérébral. Ainsi, il a été montré dans divers travaux qu'une augmentation du taux de DHA dans les neurones, en augmentant la fluidité membranaire, entraîne une modulation de l'activité de certaines protéines et des fonctions dont elles sont responsables.

Grâce à une technique électrophysiologique d'enregistrement des courants ioniques transitant à travers les membranes cellulaires, il a été montré que le DHA, par sa capacité à interagir avec un domaine externe des canaux potassique, inhibait leur dépolarisation dans des cultures de neurones de cortex de rats de manière dose-dépendante. Cette inhibition peut être modulée par la libération et l'interaction avec Zn^{2+} (Poling *et al.* 1996). Au cours des années, d'autres études ont démontré que le DHA modulait l'activité enzymatique des canaux potassique, sodique et calcique dans les membranes cérébrales (Kearns and Haag, 2002 ; Turner *et al.*, 2003 ; Kumosani and Moselhy, 2011) ainsi que l'activité de la voie de PI3K/AKT (Akbar and Kim, 2002) ou encore l'activité des enzymes cholinestérases dans le cerveau (Kumosani and Moselhy, 2011). Une étude a aussi rapporté que les chaînes acyles du DHA, lorsqu'il était incorporé dans les PE membranaire, augmentent l'activité de la PKC. Cette activité a été corrélée au partitionnement de la PKC au sein de la membrane, ce qui indique que la formation de domaine membranaire peut être importante pour son activation (Giorgione *et al.*, 1995). La composition en AGPI membranaire module ainsi la liaison de certains ligands à leurs récepteurs en les rendant plus ou moins accessible selon la conformation membranaire adoptée, cette composition peut aussi discriminer les protéines susceptibles de s'y associer.

Les couches lipidiques possèdent également des propriétés d'élasticité remarquables. Moduler l'asymétrie, en nombre de PL, entre les deux feuilletts de la bicouche induit une contrainte mécanique tendant à modifier la différence de surface entre les deux feuilletts et ainsi à générer une courbure de la membrane. L'énergie nécessaire à cette courbure pourrait provenir de la membrane elle-même et être induite par le contrôle de l'asymétrie transmembranaire en nombre de PL (Rauch and Farge, 2005). Lorsque l'insaturation des monocouches augmente, les membranes deviennent plus compressibles (Rawicz *et al.*, 2000). Des études de modélisation ont d'ailleurs établi que la chaîne de DHA est beaucoup plus compressible que les chaînes saturées, puisque 75% de la compressibilité des PC pourrait être attribuée à la chaîne de DHA (Koenig *et al.*, 1997). La compressibilité facilite notamment les transitions structurales des protéines membranaires ainsi que la formation de vésicules (Stillwell and Wassall, 2003). La formation de vésicule est une étape importante du trafic intracellulaire tout comme la fusion membranaire de ces

vésicules. Dans le SNC, la fusion de vésicules présynaptiques avec la membrane plasmique constitue un élément essentiel dans la transmission synaptique de signaux chimiques. Les membranes neuronales, naturellement riches en DHA, sont en partie caractérisées par leur prédisposition à former des vésicules et à fusionner. En effet, les distorsions membranaires imposées par les AGPI et la formation de segments de membrane en phase inverse augmentent le caractère déformable de la membrane (Stillwell and Wassall, 2003). Ainsi, l'ajout de DHA, sous forme libre ou sous forme de PC, augmente le caractère fusogène des liposomes, alors que l'ajout d'acide stéarique ou d'ALA n'affecte pas ce paramètre (Ehringer *et al.*, 1990). La fusion des vésicules intracellulaires avec la membrane plasmique implique le complexe SNARE. Une carence en AGPI *n-3*, et plus particulièrement en DHA chez le rat, induit une modification de ce complexe avec notamment une diminution des liaisons aux protéines synaptiques SNAP-25 et syntaxine (Pongrac *et al.*, 2007). Au contraire, il a été montré *in vitro* qu'un apport en DHA augmente la colocalisation entre SNAP-25 et la syntaxine 3, protéines effectrices de la fusion vésiculaire (Mazelova *et al.*, 2009). Un apport important en DHA ne doit cependant pas limiter démesurément l'apport en ARA, car ces deux AGPI sont importants pour le recyclage et la fusion vésiculaire contribuant aux fonctions synaptiques (Liu *et al.*, 2014).

En conclusion, la composition membranaire des zones non-rafts représente un facteur clé dans l'organisation des microdomaines membranaires et dans la conformation des protéines qui y sont insérées. En effet, ces zones créent un environnement lipidique dont la viscosité, la perméabilité et l'élasticité vont directement dépendre de leur teneur en AGPI et particulièrement en DHA. La modulation de cet environnement grâce à des apports alimentaires qualitativement et quantitativement optimisés représente à notre avis un moyen pertinent d'améliorer la fonctionnalité des protéines dont l'activation dépend des rafts.

C. Effets du vieillissement sur les membranes neuronales

1. Effet global sur les teneurs en lipides membranaires

Sans omettre que le vieillissement cérébral soit un processus complexe impliquant divers facteurs, nous pensons que la variation des teneurs des différents composants des membranes cérébrales au cours du temps et sous l'influence des facteurs de risque nutritionnels participe à la fragilisation des neurones et au développement de situations pathologiques. Par ailleurs, la diminution au cours du vieillissement des taux d' α -tocophérol, un antioxydant liposoluble participant la protection des membranes contribue également à accentuer la vulnérabilité neuronale (Zhang *et al.*, 1996). Chez l'homme, l'étude de la composition en lipides membranaires de cortex frontaux de sujets âgés de 20 à 100 ans ne présentant aucun trouble neurologique ou maladie psychiatrique au moment du décès, a permis de montrer qu'après 20 ans, une perte progressive des lipides membranaires cérébraux s'opérait avec un déficit beaucoup plus marqué après 80 ans. À partir de 20 ans, les PL totaux, le cholestérol, les cérebrosides et les sulfatides sont diminués de manière curviligne avec le temps et les gangliosides subissent un changement de proportion

en faveur de GM3 au détriment de GM1 (Svennerholm *et al.*, 1994). Plus récemment, de nombreuses analyses sur la composition lipidique de différentes zones de cerveaux humains et de rongeurs ainsi que sur des neurones primaires en culture ont confirmé une altération lipidique en lien avec le vieillissement (Ledesma *et al.*, 2012).

À la même époque, des observations plus fines des différentes classes de lipides montrent une perte modérée du taux de cholestérol *in vitro* et *in vivo* dans des membranes de neurones d'hippocampes de rongeurs âgés (Ledesma *et al.*, 2012). Cette diminution pourrait résulter en partie de l'augmentation de l'activité de l'enzyme Cyp46 responsable de l'hydroxylation du cholestérol en 24S-hydroxycholestérol, comme cela a été montré dans un modèle de neurones soumis à un stress pro-vieillessement induit par des ERO. Cette voie enzymatique est la principale voie de catabolisme du cholestérol cérébral et le 24S-hydroxycholestérol, qui est lui-même un répresseur des enzymes synthétisant le cholestérol, ce qui entraîne une baisse de 25 à 30% du cholestérol de la membrane plasmique (Sodero *et al.*, 2011a, 2011b). Un faible taux de cholestérol a également été observé dans des neurones d'hippocampes maintenus en culture durant 25 jours en comparaison avec des neurones jeunes, de même qu'une réduction de 20 à 30% du cholestérol des membranes d'hippocampe de souris âgées de 20 mois (Martin *et al.*, 2008). Chez l'homme, l'étude du cerveau de sujets âgés de 33 à 92 ans a mis en évidence que les modifications de cholestérol sont très variables allant d'aucun changement à une diminution de 40%. Ces diminutions seraient d'ailleurs plus marquées dans les régions de l'hippocampe et du cervelet (Söderberg *et al.*, 1990). Dans l'hippocampe, il a également été détecté une diminution âge-dépendante de la synthèse de cholestérol et un niveau augmenté de Cyp46 (Martin *et al.*, 2008). L'ensemble de ces données suggèrent que le vieillissement soit accompagné d'une diminution de la synthèse et d'une augmentation du catabolisme du cholestérol menant à une diminution globale de ce lipide. Dans certaines régions du cerveau, il n'a pas été observé de changement significatif des taux de cholestérol relatif à l'âge ce qui peut témoigner que les niveaux de cholestérol subissent des réponses différentes au cours du vieillissement selon les besoins métaboliques de chacune des aires du cerveau. De plus, la distribution des transporteurs des lipoprotéines, de leurs récepteurs et de l'expression des enzymes synthétisant le cholestérol diffèrent selon les régions cérébrales, ce qui peut accentuer cet effet d'hétérogénéité (Ledesma *et al.*, 2012).

L'augmentation des niveaux de SM a également été observée dans les synaptosomes de souris âgées (Yamamoto *et al.*, 2008) et le ratio SM/cholestérol croît dans les neurones d'hippocampes âgés *in vitro* et *in vivo*, suggérant un impact du vieillissement sur les rafts vu la place de ces lipides dans leur structure (Trovò *et al.*, 2011). Les taux de céramides, issus du métabolisme de la SM, subissent, quant à eux, une augmentation progressive et remarquable dans les différentes aires du cerveau au cours du vieillissement chez l'homme et dans les neurones en culture contribuant sans doute à l'activation de voies proapoptotiques (Prinetti *et al.*, 2000 ; Cutler *et al.*, 2004). La présence de gangliosides semble aussi être modulée par la structure des céramides qui subissent des changements dépendant de l'âge. Ainsi, le ratio des gangliosides issus d'espèces à 20 et 18 carbones est largement augmenté dans les cerveaux âgés

d'humains et de rongeurs (Sonnino and Chigorno, 2000) et dans les cultures de neurones âgés *in vitro* (Prinetti *et al.*, 2000).

Concernant, la composition cérébrale en PL totaux chez l'homme, il semble qu'elle varie peu et diminue de 5 à 10% pour les sujets les plus âgés, après 80 ans (Söderberg *et al.*, 1990). Mais au-delà des variations quantitatives, la présentation des propriétés des différents AG que nous avons faite précédemment montre à quel point il est important de considérer l'aspect qualitatif de la composition des membranes. Le *ratio* des AGS et AGI est en effet l'un des facteurs clés influençant la fluidité des membranes cellulaires et des perturbations de ce *ratio* ont des implications dans le développement de maladies neurologiques (Ledesma *et al.*, 2012). Dans le cerveau de rats âgés, il a par exemple été montré une diminution progressive des AGS et des augmentations réciproques des AGMI (Ulmann *et al.*, 2001 ; Létondor *et al.*, 2014). Des résultats similaires ont été décrits dans le cortex humain où une diminution de la composition en AGPI associée à une augmentation de l'activité et de l'expression des gènes codant pour la stéaroyl-CoA désaturase (ou $\Delta 9$ désaturase) a été observée, favorisant la transformation des AGS en AGMI (McNamara *et al.*, 2008 ; Ledesma *et al.*, 2012).

Diverses autres modifications concernant les AG ont aussi été rapportées, notamment dans des cortex cérébraux de rats âgés de 4 et 24 mois, des réductions du taux d'incorporation du linoléate dans les GPL et de son renouvellement ont été montrées avec l'âge. En outre, dans les GPL de rats âgés, le dérivé hydroperoxyde du linoléate est retrouvé à un niveau plus élevé que chez les animaux jeunes, ce qui suggère que cet AG soit éliminé plus lentement au cours du vieillissement (Terracina *et al.*, 1992). Toujours dans le cortex de rats âgés, la quantité d'ARA est réduite dans les PS, PI et PE et la teneur en DHA est nettement diminué dans les PE et PS (Favrelère *et al.*, 2000 ; Ulmann *et al.*, 2001). Une réduction de la concentration en DHA a également été notée dans les PE et les PS de l'hippocampe (Favrelère *et al.*, 2000). Globalement, la composition en AGPI chez le rat âgé est modifiée dans un grand nombre de régions cérébrales étudiées (López *et al.*, 1995 ; Létondor *et al.*, 2014). Chez l'homme, le vieillissement est associé à une diminution de la teneur cérébrale en AGPI tels que l'EPA, l'ARA et le DHA. Des réductions significatives des niveaux et du renouvellement d'autres AGPI en fonction de l'âge ont également été observées dans l'hippocampe, le cortex, le striatum et l'hypothalamus. Cette baisse pourrait s'expliquer par plusieurs mécanismes dont un taux de transfert des AGPI plus faible du sang vers le cerveau, un métabolisme des AG altéré, une peroxydation enzymatique et non enzymatique des AG et/ou des altérations du niveau des enzymes désaturases ou élongases (Yehuda *et al.*, 2002 ; Dyall *et al.*, 2007 ; McNamara *et al.*, 2008 ; Ledesma *et al.*, 2012 ; Létondor *et al.*, 2014).

2. Conséquences sur les propriétés des membranes neuronales

Au regard de la place des différentes classes de lipides dans la microarchitecture membranaire, il semble évident que ces variations de la composition lipidique liées au vieillissement altère d'une part, les caractéristiques membranaires et d'autre part, la structuration des rafts et leurs propriétés, notamment

dans les membranes synaptiques. La libération de neurotransmetteurs est déterminée par la capacité des vésicules synaptiques à fusionner et cette fusion nécessite des changements structuraux. Le cholestérol supporte la fusion en contribuant à la formation de grandes courbures et l'épuisement de ce lipide entraîne une inhibition dose-dépendante de la vitesse de fusion (Churchward *et al.*, 2005). Un déficit ou une altération des niveaux de cholestérol peut limiter la capacité de fusion de la membrane synaptique âgée (Ledesma *et al.*, 2012) et ainsi impacter sur la transmission synaptique et les fonctions cérébrales. Les sphingolipides sont enrichis dans la membrane présynaptique et leurs interactions avec le cholestérol influencent aussi la fusion de la vésicule synaptique. Un ratio SM/cholestérol approprié semble être important pour la fusion vésiculaire car une augmentation du niveau de SM réduit de manière dramatique son efficacité (Haque *et al.*, 2001 ; Rogasevskaia and Coorsen, 2006). L'augmentation de la concentration en SM observée au cours du vieillissement module la capacité de fusion de la membrane synaptique (Trovò *et al.*, 2011). Les céramides, ont également une forte influence sur la courbure de la membrane et par la même sur la fusion membranaire (Churchward *et al.*, 2005). Enfin, la structure et les propriétés hydrophiles des gangliosides leur confèrent une forte capacité de courbure, ce qui leur permet une action sur la libération de neurotransmetteurs des synaptosomes (Salaün *et al.*, 2005 ; Sonnino *et al.*, 2007). La baisse de leur concentration cérébrale générale observée au cours du vieillissement mène à une diminution progressive de leurs capacités de courbure et de fusion (Posse de Chaves and Sipione, 2010).

Concernant les rafts, il a été observé dans le cerveau de rats âgées, une augmentation locale du cholestérol dans les rafts de haute densité associée à l'oligomérisation de la cavéoline-1 (Marquet-de Rougé *et al.*, 2013). Par ailleurs, dans des synaptosomes d'hippocampes de souris jeunes dépourvues de cavéoline-1, il a été noté une réduction des niveaux de protéines synaptiques telles que PSD-95, NR2A et NR2B ainsi qu'une atrophie cérébrale. Comme pour le cerveau âgé, les souris jeunes CAV-1^{-/-} ont montré des signes de vieillissement prématuré et une dégénérescence neuronale mise en évidence par une réduction significative du nombre de synapses (Head *et al.*, 2010). Le marqueur des rafts, la protéine flotilline-1, ne semble, quant à elle, pas subir de changements d'expression ou de localisation au cours du vieillissement (Inomata *et al.*, 2006). L'étude de la distribution protéique des fractions rafts dans le cerveau de rats au cours du vieillissement a montré que la concentration membranaire globale en protéines ne subit pas de modifications mais plutôt un remaniement au sein des rafts. Une réduction des capacités antioxydantes dans les préparations obtenus à partir des tissus âgés, une diminution de protéines impliquées dans la sécrétion de neurotransmetteurs comme la synapsine, une réduction de protéines synaptiques liées au cytosquelette ont notamment été observées (Jiang *et al.*, 2010).

La diminution des AGPI dans la membrane synaptique, au cours du vieillissement, peut avoir un impact négatif sur l'assemblage du complexe SNARE et donc perturber la transmission synaptique (Schumann *et al.*, 2011 ; Ledesma *et al.*, 2012). De plus, ces AG sont particulièrement sensibles au stress oxydant et la peroxydation des lipides membranaires, observée au cours du vieillissement. Cette sensibilité peut modifier l'alignement et la conformation des membranes et ainsi altérer ses fonctions biophysiques

comme le profil de polarité, l'épaisseur de la bicouche ainsi que le comportement de la membrane en phase thermique. Les conséquences se manifestent par une dynamique structurale modifiée conduisant à augmenter la perméabilité, la diffusion transmembranaire, la perte d'asymétrie et à moduler des phases de ségrégation qui sont à l'origine de la formation des rafts. Ces effets sont probablement dus à l'interférence avec les fonctions des protéines associées à la membrane, qui, par la suite peuvent influencer les voies métaboliques. Des corrélations entre peroxydation lipidiques et maladies dégénératives comme la MA ont d'ailleurs été établies (Volinsky and Kinnunen, 2013).

3. Anomalies des rafts et vieillissement cérébral pathologique

La composition en lipides est régulée à l'état physiologique pour maintenir des fonctions cellulaires optimales dans le SNC. Les altérations du métabolisme lipidique sont associées à un dysfonctionnement cérébral pouvant conduire à une activité anormale des rafts. Une variété de ces atteintes a été corrélée avec le processus normal de vieillissement, comme il a été décrit précédemment, cependant, une exacerbation de ces procédés peut conduire à des maladies neurodégénératives. Des modifications de la composition et de l'organisation des rafts ont d'ailleurs été signalées comme un facteur commun à diverses maladies du SNC, dont la MA (Sonnino *et al.*, 2013).

Un rôle causal des altérations du métabolisme du cholestérol a vigoureusement été débattu dans le cas de la MA. Le risque de développer cette pathologie a d'ailleurs clairement été corrélé à des mutations dans le gène de l'apolipoprotéine E, protéine impliquée dans le transport et la redistribution du cholestérol (Cook *et al.*, 2003 ; Hooijmans *et al.*, 2009). Le rôle du métabolisme et de la composition en SL a également été discuté et reste très controversé. L'étude de cerveau de patients atteints de MA a, par exemple, montré une réduction de sulfatides et de SM et une augmentation des taux de céramides (Eckhardt, 2008 ; Han *et al.*, 2011 ; Filippov *et al.*, 2012 ; Cheng *et al.*, 2013 ; Panchal *et al.*, 2014). Une dérégulation du métabolisme des gangliosides a également été rapportée (Crino *et al.*, 1989). Des altérations de la composition en lipides des rafts pourraient entraîner dans le cerveau un fonctionnement défectueux des protéines associées, et par conséquent une signalisation anormale qui peut contribuer au déclenchement de la maladies neurodégénératives (Marin *et al.*, 2013 ; Sebastião *et al.*, 2013 ; Sonnino *et al.*, 2013). Des modifications de la distribution du cholestérol au sein des rafts ont été décrites dans le cortex de cerveaux de patients atteints de MA, ce qui pourrait favoriser la fibrillation du peptide A β . De plus, la diminution des concentrations en DHA dans ces cerveaux pourrait jouer sur la structure des rafts en modifiant leur taille, leur stabilité et leur distribution. Les conséquences seraient alors multiples et toucheraient la dynamique des protéines transmembranaires, la fluidité, l'élasticité, la perméabilité et la fusion membranaire ainsi que la liaison des protéines à leurs récepteurs membranaires affectant finalement la transduction des signaux (Martín *et al.*, 2010).

L'association entre les rafts et le métabolisme de la protéine APP fait notamment l'objet de nombreuses études. Les rafts contiennent non seulement la protéine APP mais aussi tous les composants

impliqués dans la voie amyloïdogène dont les enzymes protéolytiques, BACE1 et les présénilines (PSEN) appartenant au complexe γ -sécrétase (Marin *et al.*, 2013 ; Sebastião *et al.*, 2013 ; Fabelo *et al.*, 2014). La production d'A β localisée dans les rafts suggère que la voie amyloïdogène puisse être modulée par la modification de la composition et de l'organisation des lipides des rafts. Une palmitoylation des résidus cystéines de BACE1 favoriserait son association aux rafts (Vetrivel and Thinakaran, 2010). De plus, il a été montré que la flotilline-1 pouvait lier directement les motifs di-leucines de la queue cytoplasmique de BACE1. La flotilline serait donc impliquée dans le tri endosomal de BACE1, favorisant sa localisation vers les rafts et favorisant ainsi la production du peptide A β (John *et al.*, 2014). Mécaniquement, la convergence d'APP et de BACE1 dans les rafts permet une interaction plus étroite entre les deux protéines facilitant le β -clivage et finalement la production d'A β (Sakurai *et al.*, 2008 ; Fabelo *et al.*, 2014). En outre, l'activité β -sécrétase serait renforcée lorsque l'enzyme est ciblée dans les rafts (Sebastião *et al.*, 2013). Les sous-unités nicastrine et APH1, composants du complexe γ -sécrétase, subissent, elles aussi, une palmitoylation sur leurs résidus cystéine, ce qui contribue à leur stabilisation et leur association aux rafts où elles s'assemblent aux PSEN et à PEN-2 pour former le complexe γ -sécrétase fonctionnel (Vetrivel and Thinakaran, 2010). La composition des rafts influence donc le clivage de la protéine APP et inversement, son clivage affecte la composition lipidique cellulaire car la libération du domaine AICD, un métabolite intracellulaire d'APP, a la capacité de modifier la composition des rafts par son rôle sur la régulation du métabolisme lipidique, en particulier la synthèse des plasmalogènes (famille des PL) (Grimm *et al.*, 2011b, 2011c).

Après la formation du peptide A β soluble, les étapes sont l'oligomérisation et la conversion en formes agrégées nécessaires à la formation de fibrilles insolubles (Sonnino *et al.*, 2013). La liaison d'A β aux gangliosides de la membrane des rafts, en particulier à GM1, induit des transitions structurelles et des changements conformationnels du peptide, ce qui mène à son oligomérisation et sa translocation à l'extérieur des rafts. Les concentrations de GM1 et GM2 sont d'ailleurs augmentées dans le cortex frontal de cerveaux de patients atteints de MA et les niveaux de GM1 et GM2 ont été corrélés à l'accélération de la formation de plaques amyloïdes dans le cerveau de patients atteints de MA et dans des modèles murins de MA (Michel and Bakovic, 2007 ; Marin *et al.*, 2013).

En contrepartie, l'administration de DHA chez des souris transgéniques modèles de MA provoque une réduction de l'accumulation de peptide A β dans le cerveau en association avec des altérations de la distribution subcellulaire des sécrétases. En présence de DHA, la répartition du cholestérol membranaire est perturbée, ce qui s'associe une dislocation des rafts et ce phénomène est accompagné d'un déplacement de l'activité de la γ -sécrétase et des concentrations de PSEN1 (Grimm *et al.*, 2011a ; Torres *et al.*, 2013). Ces résultats sont soutenus par des études sur des modèles membranaires pour lesquelles il a été montré que l'incorporation de DHA dans les membranes réduit l'affinité des oligomères d'A β fibrillaire pour celle-ci (Torres *et al.*, 2013). Dans l'ensemble, le DHA dirige le traitement de la protéine APP de la voie amyloïdogène vers une transformation non-amyloïdogène, pour réduire efficacement la libération d'A β

(Grimm *et al.*, 2011a). L'effet du DHA sur cette réduction n'est pas la conséquence d'un mécanisme unique mais le résultat de multiples effets combinés.

En résumé, les lipides sont les composants fondamentaux des membranes biologiques. Le DHA est l'AGPI *n*-3 majoritaire des PL membranaires cérébraux et il joue un rôle primordial dans la neurotransmission, la plasticité synaptique, la réponse aux facteurs neurotrophiques, les fonctions cognitives ou encore la survie neuronale. L'un des mécanismes avancé pour expliquer ces effets est son impact sur le maintien de l'architecture et de la fluidité des membranes neuronales. Une grande variété d'altérations de la composition lipidique du cerveau a été corrélée avec le processus de vieillissement normal comme avec le vieillissement pathologique. Il est difficile d'établir un lien causal entre ces nombreuses et complexes modifications et le déclin cognitif. Cependant, il existe des preuves que ces changements puissent avoir des effets importants sur les propriétés physico-chimiques des membranes et particulièrement sur les rafts suggérant que le maintien de leur intégrité puisse représenter une stratégie pour prévenir ou ralentir des dysfonctionnements neuronaux et la vulnérabilité du cerveau exacerbée par le vieillissement.

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

Il est de plus en plus reconnu qu'en plus des éléments génétiques, divers facteurs environnementaux exercent une influence directe sur le processus de vieillissement, mais la complexité des mécanismes mis en jeu a jusqu'ici empêché d'identifier un biomarqueur spécifique et sélectif de ce processus. Il est ainsi quasiment impossible de prédire quels individus évolueront vers un vieillissement réussi plutôt que pathologique. L'allongement de la durée de vie et le recul parallèle de l'espérance de vie sans incapacité reflète d'ailleurs la prévalence croissante des maladies liées au vieillissement susceptibles d'altérer l'autonomie des personnes âgées. Dans ce contexte, prévenir et limiter les mécanismes qui mènent au vieillissement pathologique sont d'une importance indiscutable, surtout pour des pathologies comme la MA pour lesquelles aucun traitement curatif n'est encore disponible. La MA débute par une phase prodromique asymptomatique durant laquelle il est admis que les oligomères d'A β solubles sont les agents neurotoxiques responsables des atteintes synaptiques et mnésiques. Le caractère fusogène du peptide A β suggère que la cascade moléculaire responsable des troubles observés puisse trouver son origine dans les interactions du peptide au niveau de la membrane plasmique. La nature de ces interactions pourrait ainsi dépendre du statut lipidique, de la composition et de l'organisation de la membrane plasmique. Il serait donc intéressant d'intervenir durant cette période, en influant sur la toute première étape de la cascade neurotoxique. Par ailleurs, de nombreuses cibles thérapeutiques comme les récepteurs ou les transporteurs sont situées dans la membrane et il est logique d'imaginer qu'une membrane, anormalement remodelée par le vieillissement et/ou les déséquilibres alimentaires, ne soit plus apte à fournir un environnement optimal à leur fonctionnalité.

Dans ce contexte, il nous a paru intéressant d'étudier les effets sur la membrane du vieillissement et des apports alimentaires en lipides. Sur la base de résultats antérieurs et des données de la littérature, notre hypothèse de travail considère donc que les fonctions cérébrales dépendent, entre autres, de la composition et de l'organisation des membranes neuronales. En conséquence, ces désordres métaboliques et/ou ces déséquilibres alimentaires liés à un apport excessif en acides gras saturés ou en cholestérol pourraient exacerber les anomalies cérébrales décrites au cours du vieillissement biologique et/ou pathologique. À l'inverse, une optimisation qualitative du régime alimentaire incluant notamment une supplémentation en AGPI *n*-3, et plus particulièrement en DHA est susceptible de corriger ou prévenir les effets sur la membrane et ainsi préserver les fonctions neuronales dans le cerveau de l'individu âgé.

Les dyslipidémies pourraient alors impacter les membranes comme facteurs pro-vieillessement, alors que l'apport nutritionnel en AGPI *n*-3 pourrait représenter une stratégie pertinente pour préserver la les propriétés des membranes neuronales et, en conséquence, la fonctionnalité des cibles thérapeutiques d'intérêt pour la MA qui y seraient associées. Une telle stratégie interventionnelle à base d'EPA ou de DHA

notamment, administrée lors des stades prodromiques ou précoces de la maladie, pourrait donc être envisagée comme traitement adjuvant de ces approches pharmacologiques neuroprotectrices.

L'objectif général de ce travail de thèse est de faire la preuve du concept selon lequel des stratégies alimentaires préventives peuvent être primordiales pour maintenir une capacité de réponse efficace et appropriée aux thérapeutiques au cours du vieillissement.

En utilisant la souris sauvage C57BL/6J comme modèle d'étude, ce projet a permis de viser quatre objectifs spécifiques différents.

1. Déterminer l'impact fonctionnel des effets du vieillissement sur le cerveau, en suivant la réactivité d'une cible thérapeutique préalablement validée au laboratoire pour ses propriétés anti-Alzheimer, la voie neuroprotectrice du CNTF (facteur neurotrophique ciliaire), choisie comme cible modèle ;
2. Déterminer l'impact fonctionnel d'un régime hyperlipidique sur le cerveau et cette cible en particulier ;
3. Déterminer l'influence de la composition des membranes neuronales sur la distribution protéique des sous-unités du récepteur du CNTF dans les différents domaines membranaires ;
4. Valider l'hypothèse qu'une modulation de la composition et de l'organisation des membranes neuronales par une supplémentation en DHA permet de préserver ou d'améliorer la fonctionnalité de cette cible modèle dans des modèles âgés ou exposés à un régime hyperlipidique.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Études animales

A. Animaux et conditions d'hébergement

Des souris mâles de la souche C57Bl/6J (laboratoire Janvier, Le Genest St-Isle, France) ont été utilisées à un âge compris entre 6 et 24 mois au moment des tests. Les animaux ont été hébergés 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 jour/nuit de 12 h. Les souris ont été placées en cages individuelles transparentes, avec accès *ad libitum* à l'eau de boisson et à l'aliment. Elles ont ainsi été acclimatées aux conditions d'hébergement pendant au moins 2 semaines avant le début des expériences. Les installations, placées sous la responsabilité du Dr M-C Lanhers, ont été agréés par le comité vétérinaire de Meurthe-et-Moselle (Nancy) sous le numéro d'autorisation A54-547-24. Toutes les procédures d'expérimentation animale de cette thèse ont été réalisées en accord avec la réglementation française et en conformité avec la directive européenne (2010/63/UE) sur la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) et le bien-être des animaux. Ce projet a été approuvé par le comité d'éthique local CELMEA (2012-0026, le 11 décembre 2012).

B. Traitements

1. *Régimes alimentaires*

Selon les expérimentations, 3 régimes différents ont été administrés aux souris lors de programmes nutritionnels d'une durée identique de 10 semaines adoptée pour son efficacité vérifiée.

- Régime Std : régime standard composé de 18% en kcal de lipides (Tableau VIII) apportés par de l'huile, fourni par Harlan Laboratories (Gannat, France), garantissant un apport standard en nutriments essentiels et disponible *ad libitum* pour les souris. Ce régime a été utilisé comme régime témoin dans toutes nos études.
- Régime HL : régime hyperlipidique composé de 60% en kcal de lipides saturés (Tableau VIII) apportés principalement par du lard (Figure 29), fourni par SDS Dietex (Saint Gratien, France), disponible *ad libitum* pour les souris. Des souris âgées de 3 mois ont été placées sous ce régime durant 10 semaines dans le but d'augmenter les apports lipidiques alimentaires.
- Régime DHA+ : composé du régime Std supplémenté en DHA (Tableau VIII) sous forme d'ester éthylique (DHA-EE) afin d'obtenir une teneur finale de 0,3% de DHA (m/m), disponible *ad libitum* pour les souris. Des souris âgées de 16 mois ont été placées sous ce régime durant 10 semaines dans le but d'augmenter les apports nutritionnels en DHA.

Tableau VIII: Composition des régimes alimentaires

Composition	Régime Std (Harlan)	Régime HL (SDS Dietex)	Régime DHA+ (Harlan)
Lipides			
% (m/m)	6,2	34,3	6,5
kcal / g	0,56	3,09	0,59
% kcal	18	60	19
dont			
AGS (%)	0,9	10,3	0,9
AGMI (%)	1,3	10,1	1,3
AGPI n-6	3,1	5	3,1
AGPI n-3	0,3	0,4	0,3 + 0,3 DHA-EE
Ratio n-6/n-3	10,3	12,5	5,2
Cholestérol	/	/	/
Protéines			
% (m/m)	18,6	25,9	18,6
kcal / g	0,75	1,04	0,75
% kcal	1,77	20	1,77
Glucides			
% (m/m)	44,2	25,0	44,2
kcal / g	1,77	1,01	1,77
% kcal	58	20	58
Fibres			
% (m/m)	3,5	5,0	3,5
Autres			
% (m/m)	5,3	4,8	5,0

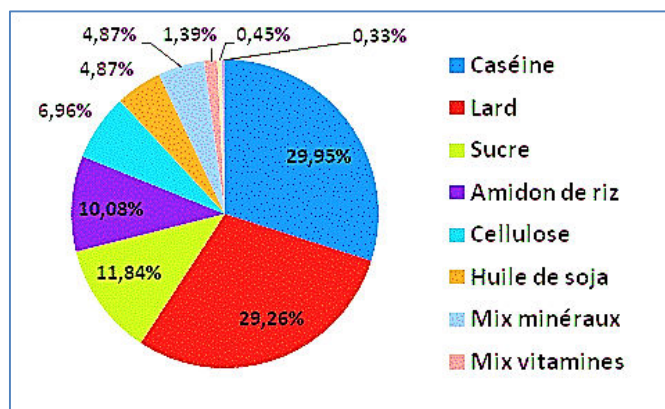


Figure 29 : Ingrédients composant le régime hyperlipidique

(d'après SDS Dietex)

2. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins sont réalisés à partir de la veine faciale (sous-maxillaire) sur des souris sous anesthésie gazeuse (isoflurane). Un volume total de 100 µL de sang est recueilli à chaque prélèvement en utilisant une aiguille (Ø 0,45 ; 26G x 5/8'') dans un tube en polypropylène contenant 5% d'EDTA. Le plasma est immédiatement séparé par centrifugation 5 min à 12.000 x g, puis dosé immédiatement ou stocké à -20°C pour des analyses ultérieures.

3. Mesures de la masse corporelle et de l'apport alimentaire

Pour chaque souris individuellement, la masse corporelle a été mesurée par pesée une fois par semaine et l'apport alimentaire a été évalué par pesée des croquettes restantes et calcul de la différence avec la quantité fournie dans la mangeoire, respectivement une et deux fois par semaine pour les régimes Std et HL et pour le régime DHA+.

4. Chirurgie stéréotaxique

a. Préparation des solutions injectables

Le peptide A β ₁₋₄₂ acquis auprès de Bachem (France) est préparé selon la méthode décrite par Pillot *et al.* (1996, 1999). Au moment de l'utilisation, des aliquotes de la solution stock sont rapidement évaporées sous azote, solubilisées à la concentration voulue (0,5 nmol dans 1 μ L) dans une solution de NaCl à 0,9% (m/v) et conservées en fractions congelées à -20°C afin d'éviter l'agrégation des peptides. Ainsi préparée, la solution d'oligomères solubles d'A β contient principalement un mélange de monomères, dimères, trimères et tétramères (Pillot *et al.*, 1996, 1999 ; Malaplate-Armand *et al.*, 2006). Le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF, Sigma, France) est solubilisé à une concentration de 1 mg/mL dans une solution saline PBS de tampon phosphate (pH 7,4) et conservé en fractions congelées à -20°C.

b. Anesthésie

Les injections intracérébrales ont été menées 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. La durée moyenne de l'anesthésie est de 2 h.

c. Injection intracérébrale

Le protocole adopté pour cette injection a été optimisé et décrit en détail dans une publication préalable de l'équipe (Youssef *et al.*, 2008). La souris sous anesthésie est installée dans un appareil stéréotaxique muni d'un micro-injecteur automatique (Unimécanique, France). L'intervention chirurgicale est exécutée aussitôt, en conditions d'asepsie. La tête de la souris est maintenue en place par un système de fixation sur le plan sagittal et le plan frontal, grâce respectivement à deux barres d'oreilles introduites dans les pavillons et à un mors derrière lequel les incisives de l'animal sont glissées. Le museau est bloqué et la position de la tête ajustée de sorte que la hauteur de la surface osseuse soit la même aux points *lambda* et *bregma* (Figure 30). La peau de la région dorsale du crâne est alors 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 et nettoyé avec un coton légèrement imbibé d'eau oxygénée (3%). Ceci fait apparaître les sutures de croissance formant le repère anatomique correspondant au point *bregma* utilisé pour situer les différentes structures cérébrales dans l'espace selon un trièdre de référence. La pointe de l'aiguille du micro-injecteur étant positionnée sur ce point, les vis micrométriques permettent d'ajuster le « zéro », point à partir duquel sont calculées les coordonnées stéréotaxiques d'injection. Les coordonnées prises en compte pour le ventricule latéral droit et gauche ont été adaptées à nos conditions expérimentales à partir de celles de l'atlas stéréotaxique de la souris (Paxinos and Franklin, 2001) : antéro-postériorité de +0,22 mm, latéralité de ± 1 mm et profondeur de +2,5 mm.

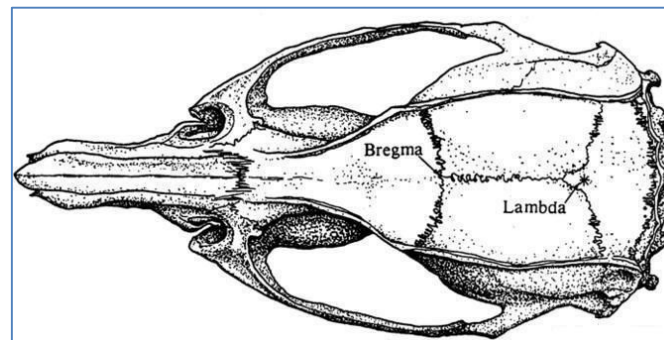


Figure 30 : Repères anatomiques de référence Bregma et Lambda sur le crâne de souris

(d'après Paxinos and Franklin, 2001)

À l'aide d'une fraise de diamètre 0,5 mm, la calotte crânienne est percée au niveau du point d'entrée de l'aiguille en prenant soin d'éviter toute lésion du sinus veineux sagittal supérieur et du réseau capillaire sous-jacent. Le crâne est nettoyé par de la biseptine, avant de réaliser l'injection 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 est injecté dans le ventricule latéral droit à un débit de 1 μ L/min, qu'il s'agisse de la solution à 0,5 mM d'oligomères solubles d'A β (soit 500 pmol), de la solution à 1 g/L de CNTF (soit 1 μ g ou 1 μ L à 44 μ M) ou de la solution saline véhicule (NaCl 0,9%, m/v). L'injection achevée, l'aiguille est laissée en place pendant 2 min afin d'éviter le reflux de la solution injectée, puis retirée doucement. Dans le cas d'une injection double, cette opération est répétée. L'orifice est ensuite recouvert d'un film de cire hémostatique (Lukens Bone Wax) et la peau de la région dorsale du crâne est suturée. La zone chirurgicale est désinfectée à l'aide de biseptine et du Metacam (0,5 mg/mL, m/v dans du sérum physiologique) est administré par une injection sous-cutanée unique à raison de 5 μ g / 10 g de souris. Pour récupérer de l'anesthésie, la souris est alors replacée en cage individuelle, sur une bouillotte pour prévenir tout risque d'hypothermie, et soumise à une surveillance étroite durant 2 j.

C. Analyses comportementales

1. *Système de capture vidéo*

Toutes les analyses comportementales ont été enregistrées à l'aide d'une caméra couplée à un système de capture vidéo (SMART, Bioseb, Vitrolles, France) doté d'un mode « 3 points » détectant la morphologie globale de la souris et discriminant la tête, le centre de gravité et la base de la queue. Ce dispositif permet l'enregistrement et la quantification semi-automatisée des performances comportementales des animaux.

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

Après administration intracérébroventriculaire (icv) de la solution véhicule, de CNTF ou d'oligomères solubles d'A β et avant toute analyse comportementale, les souris sont acclimatées dans la pièce de comportement durant 45 min. Un scénario précis validé au laboratoire, incluant différentes étapes étalées sur la période des 14 jours post-opératoires, est suivi pour évaluer les conséquences des traitements sur les capacités cognitives des souris à l'aide de différents tests comportementaux.

a. *Étude de la mémoire à court terme*

Le paradigme d'étude de la mémoire spatiale à court terme ou de travail est un système en Y, 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 et servant d'indices spatiaux pour permettre à la souris de distinguer les différents bras (Figure 31).

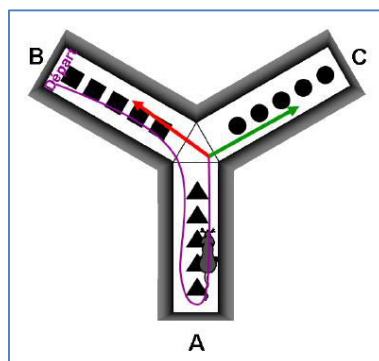


Figure 31 : Test du labyrinthe en Y pour l'évaluation de la mémoire à court terme

Dans cet exemple, la souris a été introduite dans le bras B et explore le bras A. Lorsqu'elle en sort, elle a le choix entre le bras B qu'elle a déjà exploré (flèche rouge) et le bras C encore inexploré (flèche verte). Le choix du bras inexploré conduit à une alternance (B-A-C).

L'attrait naturel des souris pour l'exploration des environnements nouveaux constitue la motivation majeure pour ce test. L'exercice se déroule en l'absence de l'expérimentateur, dans une pièce

insonorisée dont les murs sont occultés par des rideaux noirs afin d'éviter toute interférence avec l'extérieur. Le labyrinthe est éclairé indirectement à faible intensité, environ 10 lux dans chaque bras. Durant les 5 min que dure le test, l'animal explore librement le dispositif et la séquence des bras visités est enregistrée à l'aide du système d'analyse vidéo, en considérant que l'animal est entré dans le bras lorsque son train arrière passe une ligne fictive située à l'entrée du bras. La part du hasard dans ce test est 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 (Figure 31). Les performances des souris peu actives et faisant moins de 12 entrées ne sont pas prises en considération. 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 à long terme

La piscine de Morris (Figure 32) 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 aux deux tiers d'eau opacifiée par un colorant blanc, contenant une plateforme de position fixe, apparente en habituation, immergée en apprentissage et retirée en restitution. La motivation dans ce test de nage forcée repose sur le caractère aversif de la situation aquatique pour inciter l'animal à utiliser des indices externes à la piscine pour créer une carte spatiale lui permettant de trianguler sa position dans l'espace, se localiser et atteindre la plateforme (Morris, 1984). La température de l'eau est la même que celle de la pièce, maintenue entre 19 et 21°C. L'intensité d'éclairage est d'environ 100 lux.

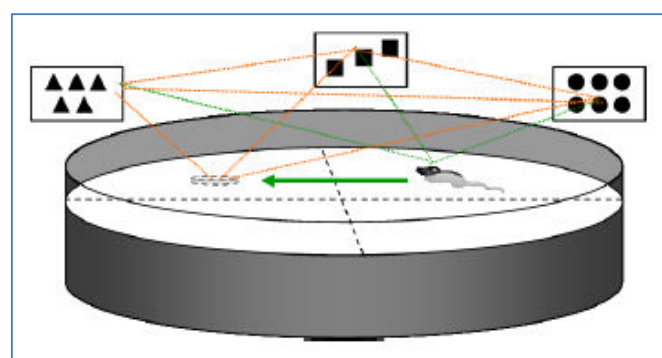


Figure 32: Test de la piscine de Morris pour l'évaluation de la mémoire à long terme

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 dans l'espace (pointillés vert) pour retrouver la position de la plateforme (flèche verte).

L'étude se déroule en trois phases : habituation, apprentissage et restitution (*probe test*).

- La phase d'habituation vise à familiariser l'animal avec les conditions expérimentales et constitue aussi un test visiomoteur. 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). Les repères extérieurs sont masqués par un rideau occultant noir autour de la piscine. Dans cette phase, la souris doit rejoindre la plateforme visible dont la position est modifiée à chaque essai. Quatre essais de 1 min espacés de 45 min sont réalisés quotidiennement sur 2 j consécutifs. Les paramètres pouvant être étudiés lors de cette phase sont le délai pour rejoindre la plateforme, la distance parcourue et la vitesse de nage, rendant compte des capacités physiques de l'animal.
- La phase d'apprentissage force l'animal à élaborer la carte spatiale permettant d'établir des relations entre les indices et repose cette fois largement sur le circuit hippocampique. Dans cette phase, la plateforme est immergée et les indices extérieurs au labyrinthe sont rendus visibles. Afin d'éviter les 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 1 min espacés de 45 min. L'animal est lâché en des positions différentes à chaque essai, selon une séquence prédéterminée défavorisant l'élaboration de stratégies non spatiales. Les paramètres étudiés sont le délai pour 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 délais moyens qui s'améliorent de jour en jour.
- La phase de restitution ou *probe test* permet d'évaluer la mémoire à long terme par la trace mnésique persistant trois jours après le dernier test de la phase d'apprentissage qui a permis de la constituer. La trajectoire de l'animal est analysée au cours d'un essai unique de 1 min, effectué dans les mêmes conditions que l'apprentissage mais sans la plateforme qui cette fois a été retirée de la piscine. Le délai d'entrée dans le quadrant de la plateforme, le délai du premier passage à l'emplacement présumé de la plateforme et le nombre de passages à cet emplacement, la fréquentation des différents quadrants de la piscine et la vitesse de nage sont les paramètres étudiés lors de cette phase.

II. Échantillonnage

A. Dissection et prélèvements tissulaires

1. *Prélèvements des structures cérébrales pour les analyses biochimiques*

La souris est anesthésiée sous une dose létale d'isoflurane (Mundipharma, France) dans une hotte d'aspiration attenante aux box d'hébergement. Après décapitation, les deux hémisphères cérébraux sont

aussitôt disséqués pour prélever l'hippocampe et le cortex. Ces structures isolées sont alors congelées en microtubes dans l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'aux analyses ultérieures.

2. Prélèvements de cerveaux entiers pour les études immunohistologiques

La souris est anesthésiée sous isoflurane (Mundipharma, France) dans une hotte d'aspiration attenante aux box d'hébergement. Elle est ensuite soumise à une perfusion intracardiaque avec du tampon phosphate salin PBS (pH 7,4) à la vitesse de 10 mL/min, puis avec 40 mL de paraformaldéhyde à 4% (m/v) en PBS (pH 7,4) à la vitesse de 5 mL/min. Le cerveau entier est alors immédiatement prélevé et fixé en formaldéhyde à 37% (m/v) (VWR) en PBS (pH 7,4) durant 24 h à 4°C , puis transféré dans une solution de saccharose à 30% (m/v) (Sigma) en PBS (pH 7,4) à 4°C jusqu'à la découpe des échantillons au cryostat (Microm HM550, Thermo Fisher Scientific) après congélation en milieu d'inclusion carboxyméthylcellulose à 4% (m/v) en eau ultrapure. Les immunomarquages des coupes de cerveau sont réalisés selon les protocoles expérimentaux décrits dans le paragraphe « Marquage par immunofluorescence » en suivant les conditions expérimentales indiquées dans les tableaux IX et X.

Tableau IX : Anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages fluorescents

Protéine ciblée	Anticorps primaires				Anticorps secondaires	
	Origine	Dilution	Fournisseur	Référence	Origine	Dilution
Récepteur du CNTF						
CNTF-R α (H-182)	Lapin	1:50	Santa Cruz	sc 292166	Chèvre	1:500
CNTF-R α (C-20)	Chèvre	1:50	Santa Cruz	sc 1913	Âne	1:500
LIFR β (C-19)	Lapin	1:50	Santa Cruz	sc 659	Chèvre	1:500
gp130 (P-18)	Chèvre	1:50	Santa Cruz	sc 32092	Âne	1:500
Marqueur membranaire						
Flotilline-1	Souris	1:500	BD Biosciences	610820	Chèvre	1:1.000

Tableau X: Anticorps secondaires utilisés pour les immunomarquages fluorescents

Cible antigénique	Origine	Dilution	Fournisseur	Référence
IgG Lapin	Chèvre	1:500	AlexaFluo 555 Invitrogen	A11055
IgG Souris	Chèvre	1:500	AlexaFluo 555 Invitrogen	A21422
IgG Chèvre	Âne	1:500	AlexaFluo 555 Invitrogen	A214230

B. Préparation de fractions riches en neurosynaptosomes

Le protocole de purification des fractions membranaires riches en 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 un tampon d'homogénéisation (10 mM Tris, pH 7,4, 0,32 M saccharose, 2 mM EDTA). L'homogénat est centrifugé à $750 \times g$ et 4°C durant 10 min. Les surnageants résultants sont à nouveau centrifugés à $12.000 \times g$ et 4°C durant 20 min. 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. L'immunodétection des protéines d'intérêt dans ces échantillons suit la procédure décrite dans le paragraphe « Analyses par immunoblot ».

C. Préparation des homogénats

Les structures cérébrales isolées sont dans un tampon RIPA composé de 25 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Nonidet NP-40, 1% (m/v) sodium désoxycholate, 0,1% (m/v) SDS, 1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 , et le cocktail d'inhibiteurs Complete (Roche). Le volume de tampon utilisé est ajusté à la taille de la structure cérébrale préparée, *ie*, 500 μL pour le cortex et 200 μL pour l'hippocampe. Les tissus sont dissociés à l'aide d'une pipette à cône bleu puis à cône jaune, et enfin avec une seringue munie d'une aiguille (\emptyset 0,60 ; 23G x 1¼"). Les échantillons sont ensuite soumis à 2 cycles de congélation (azote liquide) et décongélation (bain-marie à 37°C) avant d'être centrifugés à $10.000 \times g$ à 4°C durant 30 min. Les surnageants contenant les protéines sont récupérés et conservés à -80°C jusqu'à leur analyse. L'immunodétection des protéines d'intérêt dans ces échantillons suit la procédure décrite dans le paragraphe «Analyses par immunoblot».

D. Extraction et purification des microdomaines membranaires

1. Séparation des fractions membranaires

La méthode utilisée a été optimisée à partir de celle décrite par Ledesma *et al.* (2003) et repose sur les propriétés physicochimiques des microdomaines membranaires, en particulier leur résistance aux détergents et leur faible densité. Le détergent choisi pour cette étude est le Triton X-100 utilisé à la concentration de 1% (v/v). La procédure entière se déroule à température inférieure à 4°C . Les structures cérébrales isolées sont homogénéisées à l'aide d'un broyeur de type Potter dans un tampon d'homogénéisation contenant 10 mM Tris (pH 7,4), 0,32 M saccharose et 2 mM EDTA. L'homogénat est centrifugé à $750 \times g$ durant 10 min à 4°C . Les surnageants sont alors homogénéisés par 10 aspirations et refoulements (A/R) dans une l'aiguille (\emptyset 0,60 ; 23G x 1¼"), avant d'ajouter 4 mL de solution Tris-EDTA (5 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7,5) et de tout transférer en tube Ultraclear™ de 5 mL (Beckman-Coulter, Roissy, France) pour une ultracentrifugation à $100.000 \times g$ et 4°C durant 30 min en rotor MLA-80 (Beckman-Coulter). Le surnageant obtenu contenant les protéines solubles est aussitôt séparé et congelé à -20°C , alors que la fraction membranaire (culot) est remise en suspension dans 500 μL de tampon d'homogénéisation pour microdomaines membranaires, composé de 25 mM MES (pH 7,4), 5 mM DTT, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 , et du cocktail d'inhibiteurs Complete (Roche), puis incubé durant 1 h à 4°C sous agitation douce. L'homogénat est ensuite lysé mécaniquement par 20 A/R de pipette à cône jaune, puis 5 A/R de seringue munie d'une aiguille (\emptyset 0,60 ; 23G x 1¼"). Une aliquote de

ce lysat est prélevée pour constituer le témoin positif appelé « protéines totales ». La concentration de saccharose dans le lysat est alors ajustée à 45% par ajout d'un volume d'une solution à 90% (m/v) saccharose dans le tampon Tris à 20 mM (pH 7,4). Le mélange obtenu est déposé au fond d'un tube Ultraclear™ de 5 mL. Un gradient discontinu est ensuite formé en y superposant 3 mL de solution à 35% (m/v) saccharose (dans Tris 20 mM, pH 7,4), puis 1 mL d'une solution à 5% (m/v) de saccharose (dans Tris 20 mM, pH 7,4). Les tubes sont centrifugés à 150.000 x g et 4°C durant 18 h en rotor MLA-80. Après centrifugation, 10 fractions de 500 µL de densité croissante sont successivement prélevées à la pipette, une à une à partir du haut à partir de chaque tube, avec la précaution d'éviter de perturber le gradient établi. Chaque fraction est homogénéisée 1 à 2 min au vortex. Ce protocole ainsi mis au point est illustré de façon synthétique par la [figure 33](#).

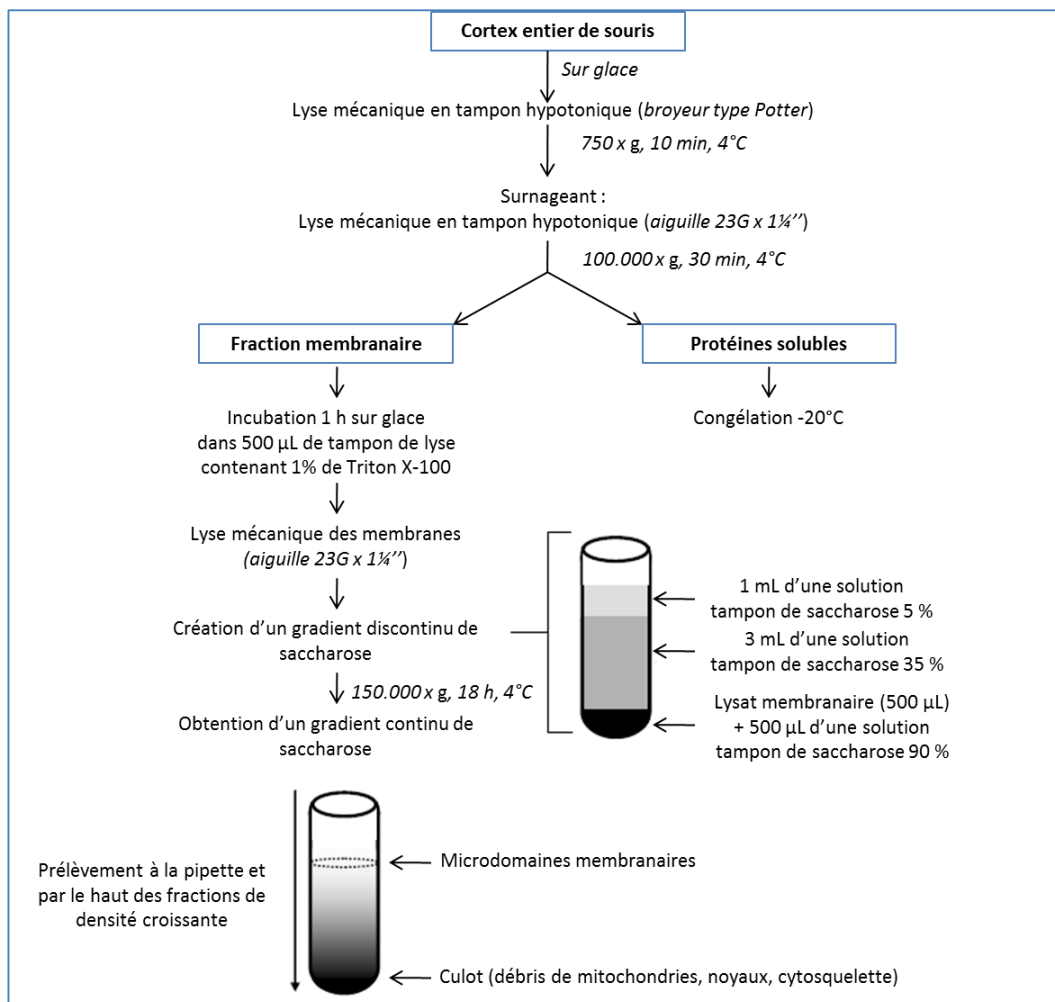


Figure 33 : Protocole d'extraction et de purification des microdomaines membranaires

2. Analyse de la composition des fractions obtenues

a. Dosage du cholestérol

Le cholestérol est un constituant structural particulièrement important des microdomaines membranaires. Pour identifier les fractions contenant ces microdomaines, le kit fluorimétrique Amplex® Red Cholesterol (Invitrogen, France) a donc été utilisé pour mesurer en microplaque la concentration du cholestérol dans les échantillons, à partir d'une gamme d'étalonnage de 0 à 4 µg/mL et à l'aide d'un standard de cholestérol, en suivant les recommandations du fabricant et aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectives de 530 et 590 nm.

b. Immunodétection des marqueurs spécifiques

Des protéines, marqueurs spécifiques des microdomaines membranaires et des régions fluides de la membrane plasmique, respectivement la flotilline-1 et le récepteur de la transferrine (rTf), ont été recherchées par immunodétection selon la procédure décrite dans le paragraphe « Analyses par immunoblot ».

III. Analyses biochimiques

A. Dosage du glucose plasmatique

Le kit enzymatique de dosage du glucose plasmatique a été acquis auprès de BioMérieux (Glucose RTU™, Craponne, France). Les dosages ont été réalisés en suivant les recommandations du fabricant et en parallèle sur un standard (Unitrol™) de concentration connue (servant à valider le dosage) et sur un calibrant multiparamétrique (Calimat™) dont le titre est connu. La concentration de l'échantillon est calculée à partir de l'absorbance et de la concentration du Calimat™.

Le glucose d'un échantillon plasmatique est dosé après la réaction spécifique :



Le peroxyde d'hydrogène formé peut alors être dosé par la réaction de Trinder (1969), libérant de la quinonéimine dont l'intensité de la coloration mesurée à 505 nm est proportionnelle au glucose initial :



B. Dosage de l'insuline plasmatique

Le kit enzymatique de dosage de l'insuline plasmatique a été acquis auprès de Millipore (EZRMI-13K Rat/Mouse Insulin ELISA, Merck Millipore, Guyancourt, France). Les dosages ont été réalisés en suivant les

recommandations du fabricant et en parallèle sur 2 standards de contrôle de qualité (QC1 et QC2) de concentrations connues et sur une gamme étalon d'échantillons de titres connus allant de 0,2 à 10 ng/mL.

Cet essai se base sur une technique ELISA en sandwich. Une plaque de microtitration revêtue d'une quantité pré-titrée d'anticorps anti-insuline permet de fixer les molécules d'insuline de l'échantillon, lesquelles attirent ensuite des anticorps anti-insuline biotinylés marqués à la peroxydase de raifort. L'activité peroxydase permet de détecter et quantifier les complexes formés en présence du substrat 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine en suivant l'augmentation de l'absorbance à 450 nm, corrigée par l'absorbance à 590 nm, après acidification des produits formés. L'augmentation de l'absorbance est directement proportionnelle à la quantité d'insuline présente dans l'échantillon inconnu. Sa concentration peut être obtenue par interpolation à partir d'une courbe de référence générée dans le même essai avec les échantillons de la gamme de concentrations connues d'insuline de référence.

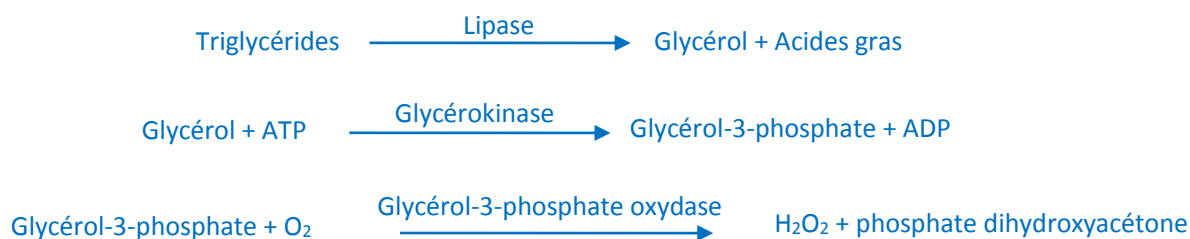
C. Dosage de la leptine plasmatique

Le kit enzymatique de dosage de la leptine plasmatique a été acquis auprès de Millipore (EZRL-83K Rat/Mouse Leptin ELISA, Merck Millipore, Guyancourt, France). Les dosages ont été réalisés en suivant les recommandations du fabricant et en parallèle sur 2 standards de contrôle de qualité (QC1 et QC2) de concentrations connues et sur une gamme étalon d'échantillons de titres connus allant de 0,2 à 30 ng/mL. Le dosage de la leptine plasmatique repose sur une technique ELISA en sandwich, exactement selon le même principe que le dosage de l'insuline plasmatique précédemment décrit.

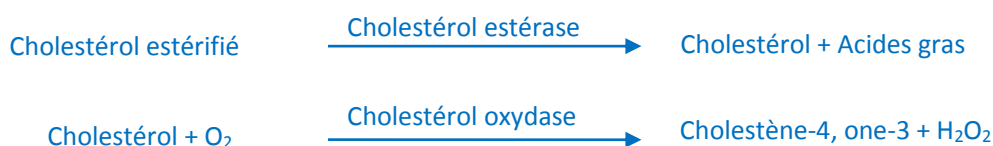
D. Dosages lipidiques

Les triglycérides et le cholestérol total ont été dosés par les kits enzymatiques de BioMérieux (Cholestérol et Triglycérides RTU™ Craponne, France). Les dosages sont réalisés en suivant les recommandations du fabricant et en parallèle sur un standard (Unitrol™) de concentration connue et sur un calibrant multiparamétrique (Calimat™) dont le titre est connu. La concentration de l'échantillon est calculée à partir de l'absorbance et de la concentration du Calimat™.

Les triglycérides d'un échantillon plasmatique sont dosés selon le principe spécifique suivant :



Quant au cholestérol total, il est dosé selon le principe spécifique suivant :



Le peroxyde d'hydrogène formé à l'issue de ces réactions spécifiques est finalement dosé par la réaction de Trinder, l'absorbance à 505 nm étant proportionnelle à la quantité de chaque type de lipide dans l'échantillon.

E. Extraction des lipides cérébraux

L'extraction se déroule dans la glace. Après dissection, les différentes structures cérébrales sont pesées, puis placées dans des tubes de 50 mL contenant 2 mL d'eau distillée. Les tissus sont alors dissociés à la seringue munie d'une aiguille (\varnothing 0,60 ; 23G x 1¼"). Le solvant d'extraction (chloroforme/méthanol 2/1, hydroxytoluène butylé 0,0015%, v/v) est ajouté et les tubes sont agités vigoureusement au vortex durant 1 min précise, puis centrifugés à 850 x g durant 10 min. La phase supérieure et l'interface sont éliminés et la phase inférieure organique est conservée à -40°C jusqu'au dosage (Rose and Oklander, 1965).

F. Dosage des acides gras

Les AG ont été dosés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Les culots érythrocytaires, ou la phase organique isolée comme décrit précédemment, sont remis en suspension dans 6 mL d'un mélange isopropanol:chloroforme (1:1), passés au vortex durant 2 min précises, puis centrifugés à 1.500 x g et 4°C durant 10 min. La phase supérieure est récupérée et évaporée à sec sous un flux d'azote à 40°C. Le résidu est ensuite repris dans 2 mL d'un mélange méthanol:dichlorométhane (3:1). Du chlorure d'acétyle (200 µL) est ajouté à chaque échantillon et les tubes sont passés au vortex puis chauffés pendant 1 h à 100°C afin de méthyler les AG. Cette réaction de transestérification (Lepage and Roy, 1986) est arrêtée par l'ajout de 5 mL de carbonate de potassium à 6% (m/v). Les tubes sont passés au vortex puis 2 mL d'hexane sont ajoutés. Chaque échantillon est homogénéisé vigoureusement, puis centrifugé à 700 x g et 4°C durant 10 min. La phase supérieure organique est prélevée et le solvant est évaporé à sec sous un flux d'azote à 40°C. Le résidu sec obtenu est ensuite solubilisé dans 40 µL d'hexane.

Les AG ainsi estérifiés sont injectés dans le chromatographe (Agilent Technologies 7890A, Massy, France), sur une colonne DB23 ((50%-cyanopropyl-phényl)-méthylpolysiloxane) de dimensions 30 m x 0,32 mm x 0,25 mm (AgilentTechnology), et séparés en phase gazeuse. 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 50°C, augmente progressivement pour atteindre 250°C et y rester 10 min. La phase mobile est constituée d'hélium dont le débit est de 1,20 mL/min dans la colonne et de 31,21 mL/min en sortie de bouteille. Après détection par

spectrométrie de masse (5975C inert XL MSD with Triple-Axis detector, Agilent Technologies), les différents pics obtenus sont intégrés à l'aide du système d'exploitation de données MPS2 GCMS Data Analysis (MS Metrix) pour le retraitement des chromatographes. Les AG de chaque pic sont identifiés en fonction de leur temps de rétention et de leur masse ionique et quantifiés à partir de gammes étalons entre 1,5 et 50 µg/mL des 10 principaux AG (Tableau XI). Le standard interne utilisé est l'acide nonadécanoïque (Sigma). Les résultats obtenus, représentent la quantité de chaque AG dans l'échantillon, exprimée en mg/mL pour les échantillons érythrocytaires et en mg/mg pour les échantillons cérébraux.

Tableau XI : Identification des acides gras par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

Acide gras	Temps de rétention (min)	Ion de quantification
Palmitate (C16:0)	15,28	270
Palmitoléate (C16:1, <i>n</i> -7)	15,53	236
Stéarate (C18:0)	17,33	298
Oléate (C18:1, <i>n</i> -9)	17,63	264
Linoléate (C18:2, <i>n</i> -6)	18,33	294
α-Linolénate (C18:3, <i>n</i> -3)	19,36	292
Arachidonate (C20:4, <i>n</i> -6)	22,75	203
Eicosapentaénoate (C20:5, <i>n</i> -3)	23,82	105
Docosatétraoate (C22:4, <i>n</i> -6)	26,05	150
Docosahexaoate (C22:6, <i>n</i> -3)	27,19	105
Nonadécanoate (C19:0)	18,8	312

G. Dosage des protéines

La concentration des protéines dans les échantillons a été évaluée à l'aide du kit BCA (BC Assay Protein Quantification Kit, Thermo Scientific, France) en suivant les recommandations du fabricant. Le dosage a été réalisé en microplaque et l'intensité de la coloration a été mesurée à 570 nm. La concentration protéique des échantillons a été calculée à partir d'une gamme d'étalonnage entre 25 et 2.000 µg/mL d'albumine précisément titrée.

H. Analyses par immunoblot

1. Électrophorèse

Les protéines sont tout d'abord séparées par électrophorèse dénaturante en présence de SDS (dodécylsulfate de sodium) selon Laemmli (1970) dans un système de migration verticale (Bio-Rad, France). Des gels de 1,5 mm d'épaisseur sont préparés, composés d'un gel de concentration à 5% de polyacrylamide en tampon (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% (m/v) SDS) sur un gel de séparation de 8 à 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). Les

échantillons à déposer sont préalablement dénaturés à 95°C pendant 5 min dans du tampon de dénaturation (125 mM Tris-HCl, pH 8,0, 4% (m/v) SDS, 10% (v/v) β-mercaptoéthanol, 0,004% (m/v) bleu de bromophénol). L'électrophorèse est réalisée en tampon de migration (1,5 M Tris-HCl, pH 8,3, 19,2 mM glycine, 0,01% (m/v) SDS), à 50 V constants lors de la concentration et 130 V constants lors de la séparation.

2. Électrotransfert

Les protéines séparées doivent ensuite être transférées sur membrane de difluorure de polyvinylidène selon Burnette (1981). La membrane est humidifiée dans le méthanol durant 20 s, puis équilibrée dans le tampon de transfert (48 mM Tris-HCl, pH 9,2, 39 mM glycine, 1,3 mM SDS, 20% (v/v) éthanol) durant 2 min. À l'issue de la migration électrophorétique, le gel est rincé durant 1 min dans le tampon de transfert avant d'être placé au contact de la membrane entre deux 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.

3. Immunorévélation des protéines

Après électrotransfert, la membrane est immergée dans la solution de blocage (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 en présence de l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage ([Tableau XII](#)), à 4°C et sous agitation orbitale durant la nuit. Après 4 passages de 5 min dans la solution de lavage (2 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20), la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase ([Tableau XIII](#)) durant 1 h à température ambiante. Après lavages et incubation dans le réactif de détection (Supersignal HRP Substrate, Merck Millipore, France), la membrane est placée dans un système d'acquisition d'images Fusion FX5 (Vilber Lourmat) permettant de numériser l'image et visualiser le signal lié à la protéine d'intérêt. Les analyses densitométriques sont finalement réalisées grâce au logiciel ImageJ (*US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*), permettant l'exploitation semi-quantitative des résultats.

Tableau XII : Anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages

Protéines ciblées	Anticorps primaires				Anticorps secondaires	
	Origine	Dilution	Fournisseur	Référence	Origine	Dilution
Voies de signalisation						
P-Akt (Ser473)	Souris	1:500	Cell Signaling	4051	Cheval	1:2.000
Akt	Lapin	1:1.000	Cell Signaling	9272	Chèvre	1:2.000
P-p44/P-p42 MAPK (ERK _{1/2}) (Thr202/Tyr204)	Souris	1:1.000	Cell Signaling	9106	Cheval	1:2.000
p44/p42 MAPK (ERK _{1/2})	Lapin	1:1.000	Cell Signaling	9102	Chèvre	1:2.000
P-STAT ₃ (Tyr705)	Lapin	1:1.000	Cell Signaling	9145	Chèvre	1:2.000
STAT ₃	Souris	1:1.000	Santa Cruz	sc 8019	Cheval	1:2.000
Récepteur du CNTF						
CNTFR α (H-182)	Lapin	1:500	Santa Cruz	sc 292166	Chèvre	1:2.000
CNTFR α (C-20)	Chèvre	1:500	Santa Cruz	sc 1913	Lapin	1:2.000
LIFR β (C-19)	Lapin	1:500	Santa Cruz	sc 659	Chèvre	1:2.000
gp130 (P-18)	Chèvre	1:500	Santa Cruz	sc 32092	Lapin	1:2.000
gp130 (H-255)	Lapin	1:500	Santa Cruz	sc 9045	Chèvre	1:2.000
Marqueurs membranaires						
Flotilline-1	Souris	1:2.000	BD Biosciences	610820	Cheval	1:5.000
Récepteur de la transferrine	Souris	1:2.000	Invitrogen	136800	Cheval	1:5.000
Marqueurs synaptiques						
PSD95	Lapin	1:1.000	Cell Signaling	2507	Chèvre	1:2.000
SNAP 25	Chèvre	1:2.000	Santa Cruz	sc 7538	Lapin	1:5.000
Synaptotagmine I	Lapin	1:1.000	Calbiochem	573828	Chèvre	1:2.000
Synaptophysine	Lapin	1:1.000	Cell Signaling	4329	Chèvre	1:2.000
Récepteur GluR1 du glutamate	Lapin	1:1.000	Cell Signaling	13185	Chèvre	1:2.000
Marqueur de charge						
β -Tubuline	Souris	1:5.000	Sigma	071M4830	Cheval	1:10.000

Tableau XIII : Anticorps secondaires utilisés pour les immunomarquages

Cible antigénique	Origine	Dilution	Fournisseur	Référence
IgG de lapin	Chèvre	1:2.000	Cell Signaling	7074
IgG de souris	Cheval	1:2.000	Cell Signaling	7076
IgG de chèvre	Lapin	1:2.000	Santa Cruz	sc 2922

IV. Analyses par microscopie confocale

A. Principe de la microscopie confocale

Le microscope confocal est un tomographe optique capable de réaliser des sections virtuelles d'édifices tridimensionnels complexes tels que les cellules. Le microscope à fluorescence classique capte

simultanément la fluorescence émise en tout point et sur toute l'épaisseur de l'objet, donnant de ce fait des images dont la résolution peut être altérée par l'excitation des fluorochromes situés hors du plan focal et qui peut générer un bruit de fond. La microscopie confocale à balayage laser utilise elle une configuration optique dans laquelle la source est fortement focalisée sur un point qui peut être balayé, éliminant ainsi la lumière provenant des plans défocalisés. La microscopie confocale utilise le rayon laser exciteur comme une source lumineuse monochromatique dont le faisceau, de quelques dixièmes de millimètres de diamètre, pénètre dans une préparation marquée par des fluorochromes. L'ensemble du dispositif permet alors d'acquérir des images de meilleure résolution, de plus grand contraste et d'une profondeur de champ plus faible et plus précise qu'un microscope conventionnel. L'échantillon émet alors un signal lumineux uniquement sur le point illuminé qui est «sélectionné» par un diaphragme, détecté et récupéré par des photomultiplicateurs, puis amplifié et traité afin d'améliorer le rapport signal/bruit, puis numérisé. L'image de la préparation est construite par balayage du champ par le laser, point par point, selon l'axe des X et l'axe des Y, grâce à des miroirs dichroïques. La saisie des différentes sections optiques dans l'épaisseur de l'échantillon est réalisée en se déplaçant dans la préparation suivant l'axe Z. Le microscope confocal est donc un système de visualisation qui, en permettant la localisation *in situ* très précise de multiples marqueurs moléculaires dans différents plans, s'avère indispensable à l'étude tridimensionnelle de l'organisation fonctionnelle des cellules en culture ou des coupes. Pour l'ensemble des marquages décrits dans les paragraphes suivants, les coupes ont été visualisées par un microscope confocal Fluoview® FV10iOlympus (Rungis, France). Les images ont été prises sur au moins 6 zones d'exposition différentes et analysées à l'aide du logiciel ImageJ.

B. Marquage par immunofluorescence : DuoLink® *in situ*

Le marquage DuoLink® (OlinkBioscience, Uppsala, Suède) permet de mettre en évidence une colocalisation entre deux protéines dans un tissu ou une préparation cellulaire. Cette technique repose sur des anticorps secondaires marqués d'oligonucléotides (PLA probes®) qui génèrent un signal lorsque les deux sondes PLA probes® sont proches physiquement, témoignant alors d'une colocalisation entre les deux protéines visées. Le signal détecté pour chaque paire de sondes PLA est visualisé comme un spot fluorescent rouge ou vert, quantifiable sous ImageJ et assigné à une localisation subcellulaire spécifique basée sur les images de microscopie. Le marquage est réalisé selon les indications du fournisseur. Les coupes de cerveau sont ensuite montées entre lame et lamelle grâce à la solution Fluoromount (Sigma).

V. Analyses statistiques

Les analyses statistiques nécessaires à l'interprétation des études détaillées dans cette thèse ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview, en accordant classiquement une significativité lorsque le risque

d'erreur p est égal ou inférieur à 5%. 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 telles que le test t de Student ou une analyse de variance par ANOVA, dans le but d'isoler les différences significatives entre les moyennes des groupes. Lorsqu'une significativité a été obtenue, l'identification des moyennes ayant contribué à l'effet observé a été réalisée grâce à un test *a posteriori* de Scheffé permettant des comparaisons multiples entre les groupes. La corrélation des rangs de Spearman (ρ « ρ » de Spearman) a été étudiée lorsque deux variables statistiques semblent corrélées. Il est basé sur les rangs des données et non leurs valeurs numériques elles-mêmes, ce qui le rend insensible aux valeurs éloignées. Cette corrélation est utilisée lorsque les distributions des variables sont asymétriques (statistiques non paramétriques). Les données présentées sont exprimées en moyenne \pm SEM (erreur standard de la moyenne) pour toutes les analyses.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I. Le vieillissement altère la capacité de réponse cérébrale d'une cible thérapeutique potentielle pour la MA

Le développement de stratégies thérapeutiques efficaces pour lutter contre le vieillissement cérébral, les processus neurodégénératifs et la MA représente un enjeu majeur de santé publique, aussi bien sur le plan sanitaire que socio-économique. Actuellement, les traitements disponibles ne se focalisent que sur les symptômes et l'industrie pharmaceutique rencontre des difficultés à faire émerger de nouvelles molécules susceptibles de modifier significativement l'évolution de ces processus délétères à défaut de l'inverser. La MA étant par essence une maladie du sujet âgé, il est probable que le vieillissement cérébral soit associé à des altérations du fonctionnement neuronal, avec pour conséquences des cibles cellulaires potentielles rendues inopérantes et des réponses thérapeutiques devenues défailtantes ou impossibles.

Il apparaît de plus en plus évident aujourd'hui que la précocité des interventions curatives ou préventives est un moyen d'améliorer la réponse à ces thérapeutiques. De même, la prévention des altérations neuronales liées au vieillissement représente à la fois un moyen de préserver et d'améliorer la fonctionnalité et la résistance des neurones, mais aussi d'augmenter l'efficacité de la réponse aux futurs médicaments. Par ailleurs, les désordres lipidiques et/ou les déséquilibres alimentaires font partie des facteurs de risques des nombreuses maladies liées au vieillissement, dont la MA, notamment en modulant la composition lipidique et l'organisation architecturale des membranes, ce qui peut contribuer à des dysfonctionnements, en particulier au niveau neuronal. Face à ces constats, il nous a semblé essentiel de faire le point sur l'impact de l'âge et de la dyslipidémie, deux des principaux facteurs de risque de la MA, sur la capacité du cerveau à fonctionner de façon optimale et de répondre à une thérapeutique anti-Alzheimer.

A. Étude préliminaire : choix d'un modèle de vieillissement biologique

1. *Démarche expérimentale*

L'âge étant le premier facteur de risque du vieillissement, nous avons choisi d'en étudier les effets sur des souris C57Bl/6J sauvages mâles et de comparer les niveaux de plusieurs paramètres mesurés à différents âges. L'impact du vieillissement biologique sur le métabolisme lipidique et ses effets sur la composition protéique cérébrale ainsi que sur les capacités cognitives ont ainsi été étudiés sur quatre groupes de souris âgées de 6, 12, 18 et 24 mois, correspondant à des tranches d'âges s'étalant de 20 à 80 ans chez l'homme (données vétérinaires). Pour chacune d'elle, la masse corporelle et l'apport alimentaire ont été suivis durant les 5 semaines d'hébergement et des échantillons sanguins ont été prélevés dans le but de suivre l'évolution des taux plasmatiques de glucose, de cholestérol, de TG, d'insuline et de leptine ainsi que les teneurs érythrocytaires en AG. La mémoire à court terme a également été évaluée

à l'aide du test du labyrinthe en Y. À la fin de cette période d'expérimentation, les souris ont été mises à mort pour collecter les structures cérébrales (cortex, hippocampe) au niveau desquelles la fonctionnalité synaptique a été approchée par la mesure des niveaux de protéines synaptiques (PSD-95 et SNAP-25). En considérant le groupe de souris âgées de 6 mois comme le témoin adulte jeune, l'analyse des résultats obtenus dans cette première étape a visé à identifier le groupe âge pouvant servir de modèle représentatif du vieillissement biologique.

2. Analyses des paramètres métaboliques

La masse corporelle et l'apport énergétique (calculé à partir de l'apport alimentaire) ont été mesurés une fois par semaine durant les 5 semaines d'hébergement en cage individuelle transparente. Le suivi de la masse corporelle montre une augmentation significative de 10 à 15% entre les souris de 6 mois et les trois autres groupes de souris plus âgées (Figure 34A). Toutefois, cette augmentation n'a pu être associée à une différence des apports énergétiques au cours de ces cinq semaines (Figure 34B), ce qui suggère que la prise de poids observée puisse être liée à des anomalies métaboliques.

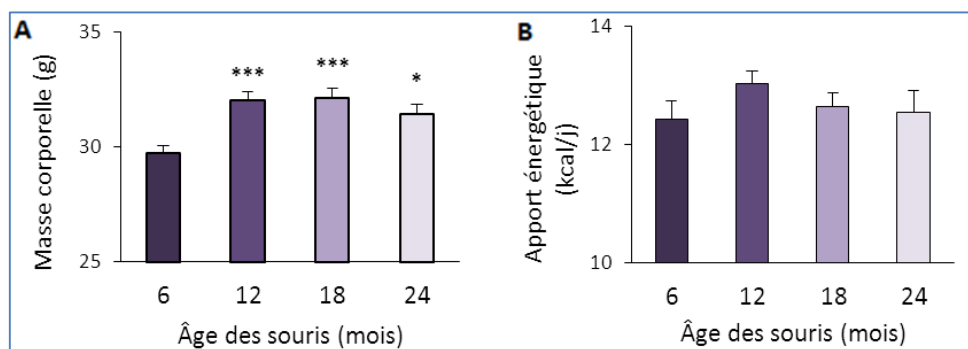


Figure 34 : Effets de l'âge sur la masse corporelle et l'apport énergétique des souris

Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe (N = 20) calculées sur 5 semaines. La significativité des différences calculées avec les souris de 6 mois est donnée par * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$.

La masse corporelle des souris de 24 mois est apparue significativement ($p = 0,0127$) plus élevée que celle des souris de 6 mois, mais moins importante que celle des souris de 12 ($p = 0,0007$) et 18 mois ($p = 0,0004$). Ceci pourrait refléter la mise en place d'un mécanisme inverse chez les animaux les plus âgés avec le début d'une perte pondérale, phénomène déjà décrit chez l'homme au cours du vieillissement après 70 ans (Beck and Ovesen, 1998, 2002). Lors de la mise à mort des animaux et du prélèvement des tissus, nous avons pu observer que les souris de 12, 18 et 24 mois présentaient une masse adipeuse sous-cutanée plus importante. Chez les animaux de 18 et 24 mois, une masse adipeuse viscérale et cardiaque plus importante a aussi été remarquée lors des dissections. Ces données pourraient corroborer l'hypothèse d'un changement de composition corporelle avec l'âge, mais qui n'a pu être mesuré de manière précise et demeure une appréciation subjective non quantifiée.

Les lipides, cholestérol et TG, le glucose, l'insuline et la leptine plasmatiques ont été analysés à l'issue des cinq semaines d'hébergement des souris. La leptine module la satiété et régule l'homéostasie énergétique ainsi que le stockage ou la mobilisation des graisses (Harvey, 2007 ; Greco *et al.*, 2008). Étant sécrétée par les cellules adipeuses et circulant dans le plasma, il n'est pas anormal de mesurer une concentration en leptine plus importante chez les groupes de souris de 12 ($p = 0,0683$) et 18 mois ($p = 0,0285$) qui présentaient les masses corporelles moyennes les plus élevées. Les valeurs de leptinémie moyenne sont ainsi passées de $0,75 \pm 0,12$ ng/mL chez les souris de 6 mois à $1,49 \pm 0,17$ ng/mL chez les souris de 18 mois (Figure 35A). Cette teneur élevée en leptine plasmatique pourrait refléter une hyperleptinémie périphérique en lien avec le développement d'une résistance à la leptine. Cela a été décrit au cours de l'obésité et du vieillissement, par le biais d'une baisse de la disponibilité de la leptine dans l'hypothalamus et d'une altération de son action périphérique (Robertson *et al.*, 2008; Tang, 2008). Les modifications de composition corporelle et de leptinémie sont des facteurs communs à l'obésité et au vieillissement, ces anomalies pouvant être associées à des dyslipidémies (Kuzuya *et al.*, 2002).

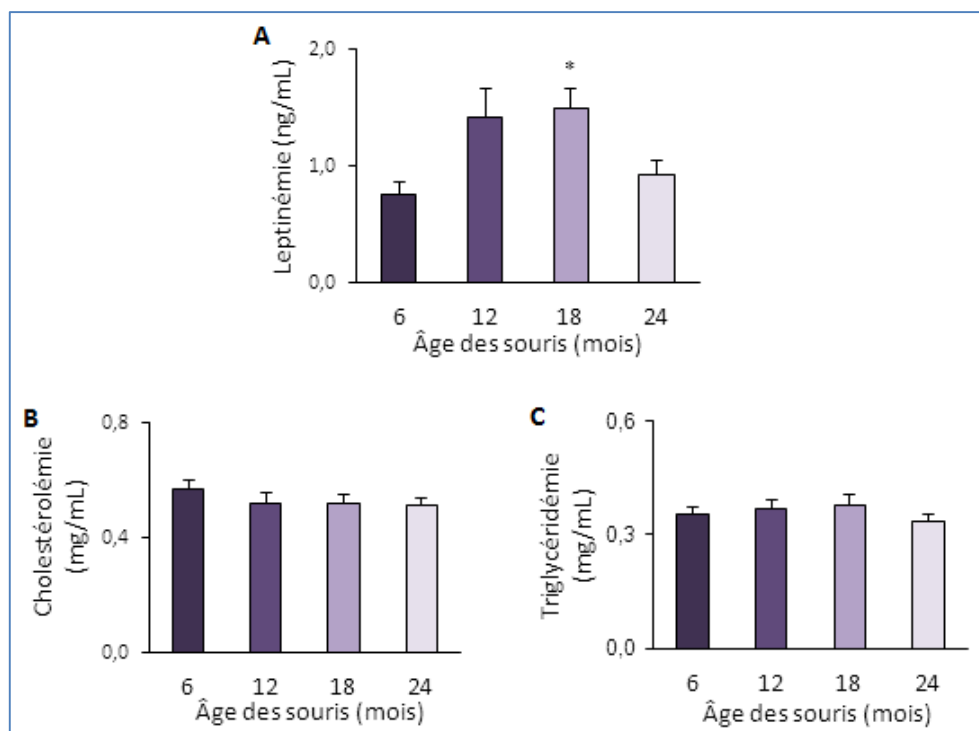


Figure 35 : Effets de l'âge sur le bilan plasmatique à jeun des souris

Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe ($N = 20$). La significativité des différences calculées avec les souris de 6 mois est donnée par $*p < 0,05$.

La mesure des taux de cholestérol (Figure 35B) et de TG (Figure 35C) plasmatiques des différents groupes de souris n'a pas mis en évidence de modifications majeures du profil de ces lipides, avec respectivement des taux moyens à jeun pour l'ensemble des groupes de $0,53 \pm 0,02$ mg/mL et de $0,36 \pm 0,02$ mg/mL. Les mesures de glycémie et d'insulinémie en phase postprandiale ou 3 h après l'ingestion du repas n'ont, elles non plus, pas permis de constater de différences significatives entre les

4 groupes de souris. Ces paramètres avaient pourtant été décrits comme sensibles et sujets à des changements au cours du vieillissement, avec souvent une atteinte du métabolisme glucidique et le développement d'une résistance à l'insuline avec l'âge (Chang and Halter, 2003 ; Basu *et al.*, 2006).

Les profils des AG dans le sang, majoritairement érythrocytaires, le cortex et l'hippocampe ont été comparés entre les différents groupes de souris. Le dosage par CPG n'a mis en évidence aucune différence significative des concentrations relatives de chacun des 10 AG majoritaires (palmitique, palmitoléique, stéarique, oléique, LA, ALA, ARA, EPA, docosatétraénoïque et DHA), que ce soit au niveau sanguin ou cérébral. Le *ratio n-6/n-3* des AGPI n'a pas semblé non plus modifié au niveau périphérique (Figure 36A) ou dans le cortex (Figure 36D), même si une tendance à la hausse est constatée chez les souris âgées de 24 mois. Cette tendance est significative par contre pour le *ratio ARA/DHA*, augmenté dans les érythrocytes (+10%, $p = 0,0218$, Figure 36B) et le cortex (+28%, $p = 0,0324$, Figure 36E) des souris de 24 mois comparé aux souris de 6 mois. Il faut noter qu'aucune différence significative n'a pu être observée dans l'hippocampe, ce qui peut aussi s'expliquer par le fait que nous avons dû limiter à 4 par groupe le nombre d'échantillons cérébraux consacré à ces dosages.

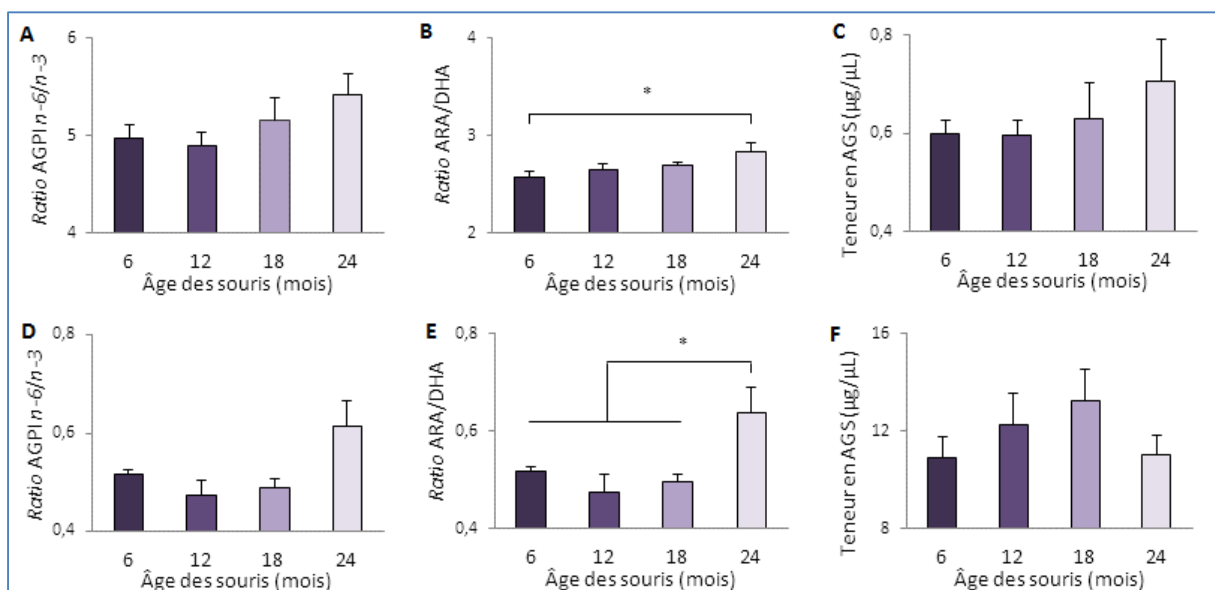


Figure 36 : Effets de l'âge sur les ratios en AGPI n-6/n-3, ARA/DHA et la teneur en AGS dans les cellules sanguines et le cortex cérébral des souris

Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe. (A), (B) et (C) : échantillons sanguins (N = 15). (D), (E) et (F) : échantillons de cortex cérébraux (N = 4). La significativité des différences calculées entre les groupes âges est donnée par * $p < 0,05$.

Nos résultats suggèrent donc assez clairement que les profils d'AG sont comparables dans les cellules sanguines et le cortex cérébral. Une corrélation entre les teneurs érythrocytaires et cérébrales en AG avait déjà été observée dans des études antérieures menées au laboratoire chez ces mêmes souris C57Bl/6J soumises à différents régimes nutritionnels. Le *ratio* entre les AGPI n-6 et n-3, et notamment celui entre ARA et DHA, semble pencher en faveur d'une augmentation des espèces n-6 lors du vieillissement, dans le cadre d'un régime Std sans apport complémentaire exogène d'AGPI, suggérant la survenue

d'altérations métaboliques. Outre le déséquilibre entre les AGPI *n-6* et *n-3* au cours du vieillissement, une augmentation des AGS avait été aussi observée chez le rat (Houtkooper *et al.*, 2011). Notre étude préliminaire a montré au contraire que les teneurs en AGS ne semblent pas différer significativement entre les groupes de souris, que ce soit dans les érythrocytes (Figure 36C) ou le cortex (Figure 36F). Mais il faut rappeler que les dosages d'AG que nous avons effectués ont livré des résultats à considérer comme des instantanés à un âge donné et non pas comme un suivi longitudinal de ces paramètres tout au long de leur vie. De plus, les grandes variations interindividuelles constatées limitent grandement la significativité et la robustesse des conclusions sur les AG. C'est aussi probablement en raison de ces variations interindividuelles que les comparaisons des différents paramètres mesurés (dosages plasmatiques, masse corporelle, apports énergétiques) ont donné des résultats relativement peu tranchés et délicats à interpréter à ce stade.

3. Analyses des capacités mnésiques

Après cinq semaines d'hébergement, la mémoire spatiale à court terme des souris a été évaluée par le test du labyrinthe en Y. Ce test, non contraignant pour les animaux, repose sur la curiosité et le comportement exploratoire spontané des souris et nous a permis de calculer le taux d'alternance spontanée liée à l'exploration successive des trois bras du Y (Figure 37). Les résultats obtenus ont montré une détérioration significative de la mémoire à court terme pour les groupes de souris âgées de 18 ($p = 0,0472$) et de 24 mois ($p = 0,0118$), avec une réduction de près de 15% de la mémoire à court terme (Figure 37A) par rapport au groupe de souris de 6 mois. Une réduction de la capacité exploratoire des souris a également été observée (Figure 37B), débutant à 18 mois et devenant significative à 24 mois ($p = 0,0045$).

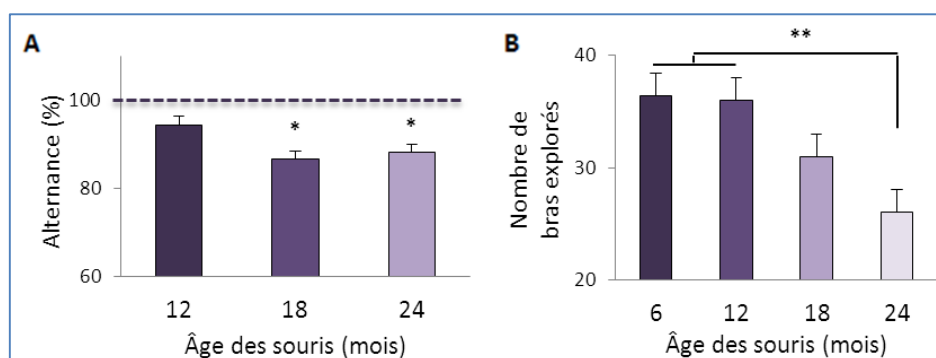


Figure 37 : Effets de l'âge sur la mémoire à court terme et la capacité exploratoire des souris

Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe ($N = 20$). (A) : résultats d'alternance exprimés par rapport à la moyenne des souris de 6 mois utilisée comme référence et représentée par la ligne pointillée à 100%. La significativité des différences calculées avec les souris de 6 mois (A) ou de 6 et 12 mois (B) est donnée par * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Après l'évaluation de la mémoire à court terme, les souris ont été rapidement mises à mort afin d'investiguer l'état des membranes cérébrales le plus tôt possible après les derniers tests. Le cortex et l'hippocampe de l'hémisphère droit ont été utilisés pour isoler les fractions membranaires riches en

synaptosomes afin d'évaluer l'intégrité des synapses par l'analyse des profils protéiques en immunoblot. Nous avons choisi comme marqueurs la protéine présynaptique SNAP-25 et la protéine post-synaptique PSD-95 (Figure 38).

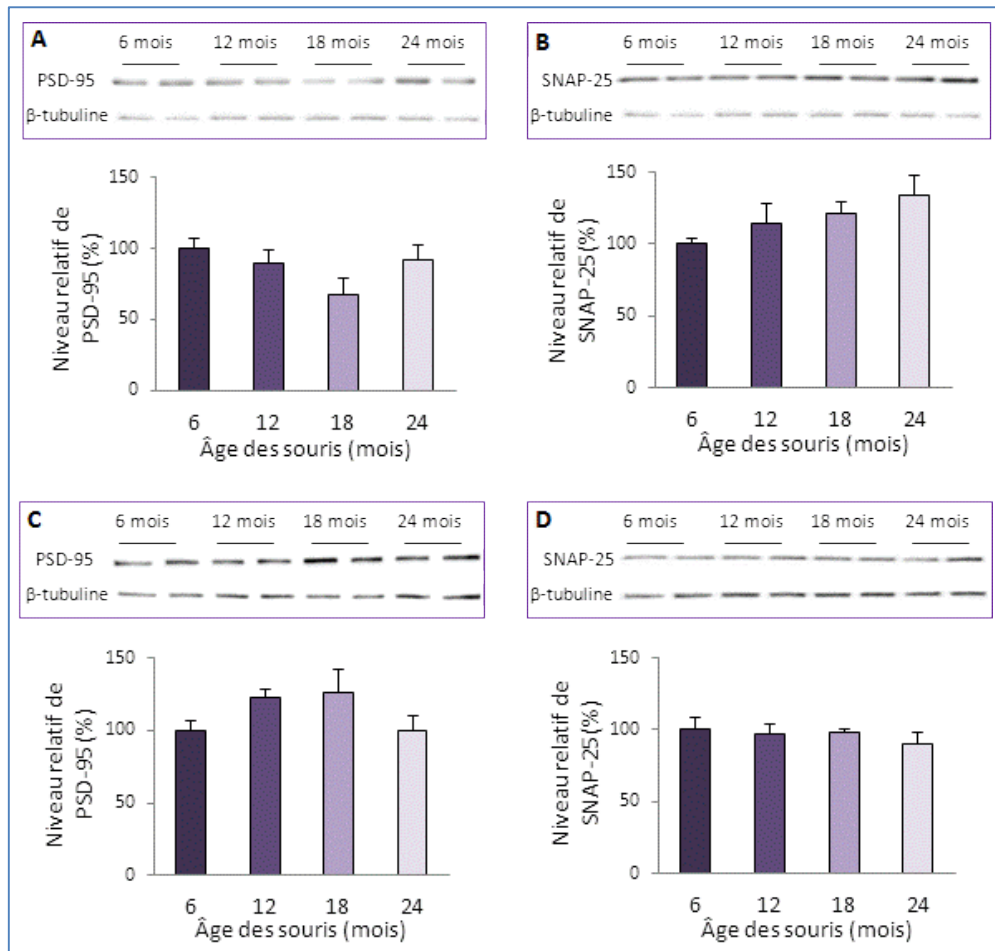


Figure 38 : Effets de l'âge sur les niveaux de protéines synaptiques dans le cortex et l'hippocampe des souris

Le niveau relatif des protéines synaptiques dans le cortex (A et B) et dans l'hippocampe (C et D) a été évalué par analyse densitométrique des immunoblots et a été normalisé par rapport à la β -tubuline. Le niveau protéique relatif calculé au sein du groupe de souris âgées de 6 mois a été utilisé comme référence et considéré égal à 100%. Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe ($n = 4$; $N = 2$).

La protéine SNAP-25 (25 kDa) est ancrée à la face cytosolique des membranes neuronales où elle participe, avec la syntaxine-1, à la formation du complexe SNARE essentiel pour assurer la fusion membranaire entre les vésicules synaptiques et la membrane plasmique nécessaire à 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 SNAP-25 est, avec d'autres protéines synaptiques comme la synaptophysine ou PSD-95, classiquement recherchée pour suivre l'acquisition du phénotype neuronal durant la maturation cérébrale (Oyleret *al.*, 1991 ; Hepp *et al.*, 2000 ; Bailey and Lahiri, 2006 ; Gottschall *et al.*, 2010). La protéine PSD-95 (95 kDa) joue quant à elle un rôle particulier dans le trafic, l'adressage aux synapses et la stabilisation des sous-unités des récepteurs du glutamate (Mondin *et al.*, 2011), essentiels à la mémoire et à la plasticité synaptique.

L'analyse par immunoblot des niveaux de PSD-95 et SNAP-25 dans le cortex (Figures 38A et 38B) et l'hippocampe (Figures 38C et 38D) des différents groupes de souris n'a pas révélé de différences significatives majeures. Les modulations des quantités de protéines synaptiques observées entre les groupes âges pourraient refléter des altérations de la plasticité synaptique propre à chaque groupe et être en lien avec l'adaptation aux facteurs de stress, externes ou internes.

4. Modèle de vieillissement biologique

Le vieillissement dit normal, biologique, est difficile à caractériser et plus encore à définir. Du reste, il n'existe pas de modèle d'étude à proprement parler. Il est l'un des processus biologiques les plus complexes, qui se caractérise par une variété de changements subtils qui s'accumulent et favorisent l'émergence d'un syndrome clinique particulier ou rendant progressivement les sujets plus sensibles aux pathologies. Le caractère pathologique du vieillissement réside finalement dans la cinétique de dégradation. Ainsi, le vieillissement est un processus continu qui reste longtemps sournois et invisible car la limite de détérioration « acceptable » n'est pas atteinte. Mais à un certain stade, la détérioration dépasse un seuil qui définit le développement pathologique, détectable cliniquement. Nous considérons que le franchissement de ce seuil peut être précipité ou au contraire retardé sous l'influence de certaines conditions qui définissent la pente du déclin particulière à chaque individu. Ces conditions peuvent être par exemple le développement de foyers tumoraux, l'épaississement de la plaque d'athérome ou les pertes neuronales.

Les connaissances actuelles nous ont montré que la durée de vie n'était pas une donnée invariable caractéristique de chaque espèce, mais qu'elle pouvait être modulée par des manipulations d'ordre génétique et des interventions nutritionnelles ou pharmacologiques (Meléndez *et al.*, 2003 ; Bishop *et al.*, 2010 ; Park and Yeo, 2013 ; Moskalev *et al.*, 2014). Le point crucial serait de comprendre les relations entre les maladies associées au vieillissement (cancers, maladies cardiovasculaires et neurodégénératives), qui rendent compte de la majeure partie des décès dans nos populations occidentales, et les processus moléculaires et cellulaires du vieillissement dit normal. Cependant, l'une des difficultés dans l'examen du vieillissement humain est sa durée. En effet, il est quasiment impossible d'étudier le vieillissement humain *in vivo* dans son intégralité et la plupart des données actuelles procèdent plutôt à une description à un moment donné, comme lors d'études ciblées sur des tissus ou organes isolés (par exemple le vieillissement artériel, des tissus minéralisés ou cutané), ou à l'étude de pathologies associées au vieillissement comme c'est le cas par exemple, lors d'autopsies du cerveau de patients atteints de MA. De plus, l'existence de maladies méconnues car asymptomatiques chez les personnes âgées posent en pratique des difficultés supplémentaires qui peuvent affecter la qualité des recherches sur le vieillissement et de leurs résultats.

Pour des raisons pratiques autant qu'éthiques, l'analyse du vieillissement humain nécessite souvent le recours à des modèles d'études plus simples, mais qui, comme tout modèle, présentent leurs avantages et leurs inconvénients. Bien évidemment, la physiologie humaine se distingue de celles des

organismes modèles dont l'emploi est parfois très discutable, de par leurs propriétés parfois caricaturales ou dont la pertinence ne se rapporte qu'à une pathologie précise et parfois même qu'à certains aspects particuliers de cette pathologie. En effet, certaines maladies rares (syndrome de Werner, progeria, trisomie 21) sont responsables d'un vieillissement prématuré et d'un raccourcissement de l'espérance de vie. Elles partagent de nombreux signes cliniques du vieillissement et peuvent donc servir de modèles d'étude du vieillissement. Ainsi, des souris transgéniques *Lmna* *HG/+*, modèle de progeria (Yang *et al.*, 2008) ou des souris *PolgA*^{-/-}, accumulant des mutations de l'ADN mitochondrial (Rötig, 2004), sont parfois utilisées pour étudier certains aspects du vieillissement, en dépit de leur inconvénient de reposer sur des anomalies génétiques et des mécanismes éloignés de ceux mis en jeu lors du vieillissement biologique.

Le vieillissement est indéniablement lié au temps qui passe, mais il procède selon un processus dont la cinétique est modulable. Il n'est pas étonnant de considérer le paramètre « âge » comme un élément déterminant des modèles d'étude. L'analyse de certains organismes présentant une longévité maximale peut également contribuer à la compréhension de mécanismes impliqués. La chauve-souris par exemple est un organisme modèle qui défie les modèles théoriques basés sur une corrélation positive entre espérance de vie et taille ou masse du corps et une corrélation inverse entre longévité maximale et activité métabolique. Ainsi, les chauves-souris (*Myotis brandtii*) sont des mammifères de petite taille qui enregistrent des records de longévité, la plus âgée ayant été capturée à 41 ans, soit une espérance de vie dix fois supérieure aux estimations théoriques. De surcroît, elles utilisent deux fois plus d'énergie que les animaux de même taille tout en vivant bien plus longtemps. Ces données suggèrent des mécanismes moléculaires sous-jacents à l'origine de leur durée de vie et font de ces animaux un modèle unique pour explorer les bases moléculaires d'une longévité exceptionnelle (Podlutzky *et al.*, 2005). Dans ce même ordre d'idée, une espèce de rongeurs, le rat Lou/C/Jall, possède une durée de vie de 34 à 39 mois en moyenne, bien supérieure à celles d'autres souches. Cette espèce est décrite comme un modèle de vieillissement réussi, car elle a la particularité de ne développer ni obésité, ni diabète, ni tumeur avec l'avancée en âge, et plus important encore de ne pas montrer de déclin cognitif (Alliot *et al.*, 2002 ; Dubeau *et al.*, 2011 ; Paban *et al.*, 2013). Mais ces espèces modèles décrivent un vieillissement optimal avec une longévité maximale et présentent donc des aspects caricaturaux qui relativisent la portée des recherches sur les mécanismes du vieillissement.

En conclusion, l'objectif de cette analyse préliminaire était d'obtenir un modèle prenant en compte l'âge seulement, et pour lequel sont observés des signes cliniques du vieillissement biologique sans atteinte pathologique identifiable. Notre choix s'est porté sur le groupe de souris de 18 mois qui présente les premiers signes d'un changement de composition corporelle et de modifications du métabolisme lipidique sans pour autant montrer de dyslipidémie ou de déséquilibre marqué de la composition en AG pouvant refléter une sensibilité ou le développement d'une quelconque pathologie. De plus, ce groupe est apparu comme sujet à une altération modérée de la mémoire à court terme, mais sans trouble du comportement exploratoire ni perturbation du profil des protéines synaptiques étudiées. Les souris C57Bl/6J sauvages

mâles âgés de 18 mois ont donc été retenues comme modèle de vieillissement biologique pour la suite de nos expérimentations. Ce modèle présente également ses limites puisqu'il a la particularité de ne prendre en compte que le facteur âge, les animaux de cette souche étant issus du même fonds génétique et élevés dans un environnement standardisé avec une alimentation contrôlée, ce qui les soustrait aux variations interindividuelles liées aux mutations génétiques et aux conditions environnementales. Mais ces animaux possèdent en contrepartie l'avantage d'être bien caractérisés dans notre laboratoire en particulier à propos de leur comportement social, alimentaire et cognitif.

B. Choix d'un modèle de voie thérapeutique potentielle contre la MA

Diverses molécules ont été testées au laboratoire et leur potentiel neuroprotecteur a été validé dans des modèles animaux de MA. Nous avons choisi de tester l'efficacité d'une de ces molécules, le facteur neurotrophique ciliaire ou CNTF, dans le modèle de vieillissement préalablement décrit. En effet, les facteurs neurotrophiques tels que les neurotrophines (NGF, BDNF, NT-3, NT-4), certaines protéines de la famille des cytokines (CNTF, IL-6, LIF) ou des peptides neuroprotecteurs (humanine, insuline, IGF-1) ont été proposés comme des molécules d'intérêt potentiel dans le traitement de la MA. Plusieurs travaux, dont ceux de notre équipe, ont démontré leur potentiel neuroprotecteur aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Arancio and Chao, 2007 ; Hennigan *et al.*, 2007 ; Greenberg *et al.*, 2009 ; Garcia *et al.*, 2010 ; Bolognin *et al.*, 2014). Ces facteurs neurotrophiques jouent un rôle majeur dans le fonctionnement cérébral, influençant la prolifération et la différenciation cellulaire, la neurogenèse, la survie neuronale, la plasticité synaptique ou les mécanismes d'apprentissage et de mémorisation (Schulte-Herbrüggen *et al.*, 2008b ; Bauer, 2009 ; Numakawa *et al.*, 2010). Nous nous sommes donc attachés à réévaluer les capacités neuroprotectrices du CNTF vis-à-vis du stress amyloïde induit dans le cerveau de souris de différents âges ou sous régime nutritionnel enrichi en lipides.

Le CNTF est une cytokine gliale de la famille de l'IL-6, constitutivement synthétisé dans le SNC par les astrocytes et agissant sur de nombreux types cellulaires (Rudge *et al.*, 1992). Physiologiquement, le CNTF participe au maintien de l'homéostasie cellulaire du SNC et sa libération dans le milieu extracellulaire après une lésion tissulaire et/ou cellulaire suggère un rôle dans la restauration du tissu nerveux (Needels *et al.*, 1985 ; Yamada *et al.*, 1995 ; Lee *et al.*, 1997). Ses propriétés sur la survie neuronale sont complexes et encore mal élucidées. Son intérêt thérapeutique a toutefois déjà été démontré contre les processus neurodégénératifs associés à la sclérose amyotrophique latérale (Aebischer *et al.*, 1996) et la maladie de Huntington (Bloch *et al.*, 2004), après implantation intracérébrale de cellules productrices encapsulées. Des données publiées par notre équipe montrent que la production continue *in situ* de CNTF par cette même technique de thérapie cellulaire présente également une indication dans la MA en protégeant des perturbations mnésiques et des altérations synaptiques associées induites par l'exposition au peptide A β soluble après injection icv ou dans le cerveau de souris transgéniques modèles de la MA (Garcia *et al.*, 2010).

Parallèlement, *in vitro*, le CNTF protège des effets cytotoxiques et proapoptotiques induits par les oligomères solubles de peptide A β dans des neurones primaires en culture (Garcia *et al.*, 2010). D'autres données de la littérature soutiennent ce potentiel thérapeutique du CNTF dans la MA. Par exemple, une étude a suggéré que le CNTF endogène peut réguler la neurogenèse adulte en augmentant la prolifération des cellules et/ou des précurseurs des cellules souches neurales (Emsley and Hagg, 2003). D'autre part, la signalisation STAT₃ induite par le CNTF a été montrée essentielle pour la formation et/ou le maintien de la neurogenèse de la zone sous-granulaire du gyrus denté dans l'hippocampe de l'adulte (Müller *et al.*, 2009). De la même manière, l'administration intra-péritonéale d'un peptide correspondant à la région biologiquement active du CNTF améliore la cognition en restaurant la neurogenèse et la plasticité neuronale chez des souris transgéniques modèles de la MA (Blanchard *et al.*, 2010).

Le CNTF agit après fixation sur son récepteur CNTF-R, complexe composé de trois sous-unités distinctes, une sous-unité CNTFR α réceptrice non transductrice liant le CNTF lui-même et d'un transducteur hétérodimérique formé de la glycoprotéine 130 (gp130) et du récepteur LIFR β du LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*). La fixation du ligand CNTF sur la sous-unité CNTFR α induit l'hétérodimérisation des sous-unités transductrices et l'activation du récepteur (Davis *et al.*, 1993 ; Buk *et al.*, 2004). Ces trois composantes sont essentielles à l'initiation de la signalisation induite par le CNTF (Suzuki *et al.*, 2009). La principale voie de signalisation intracellulaire activée par le CNTF est la voie de transduction de JAK_{1/2}-STAT₃ (Sango *et al.*, 2008). Deux voies secondaires sont également activées (Figure 39), les voies de PI3K-AKT/PKB (Müller *et al.*, 2009 ; Steinberg *et al.*, 2009) et d'ERK_{1/2} (Takahashi-Tezuka *et al.*, 1998). L'activation de ces voies explique les effets trophiques et protecteurs du CNTF puisqu'elles sont toutes impliquées notamment dans l'activation de médiateurs promouvant la survie cellulaire (ERK, AKT) et dans l'inhibition de médiateurs proapoptotiques comme Bcl₂ (Frebel and Wiese, 2006). Ancré à la membrane plasmique, l'activation du complexe récepteur CNTF-R dépend fort logiquement du microenvironnement constitué par la bicouche lipidique. Les sous-unités gp130 et LIFR β ont en effet été localisées à l'intérieur de microdomaines membranaires dont l'intégrité est déterminante pour l'activation du CNTF-R (Sehgal *et al.*, 2002 ; Buk *et al.*, 2004). La perturbation de ces domaines par un traitement par la méthyl- β -cyclodextrine, un composé qui supprime le taux de cholestérol, empêche la colocalisation des deux sous-unités du récepteur, ce qui rend son activation impossible. L'activation de la voie de transduction JAK-STAT dépend elle aussi des rafts lipidiques et repose sur leur architecture et leur composition (Sehgal *et al.*, 2002 ; Buk *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que la réponse neuronale au CNTF puisse être sensible à la réorganisation ou à la désorganisation membranaire comme celle décrite chez les individus âgés.

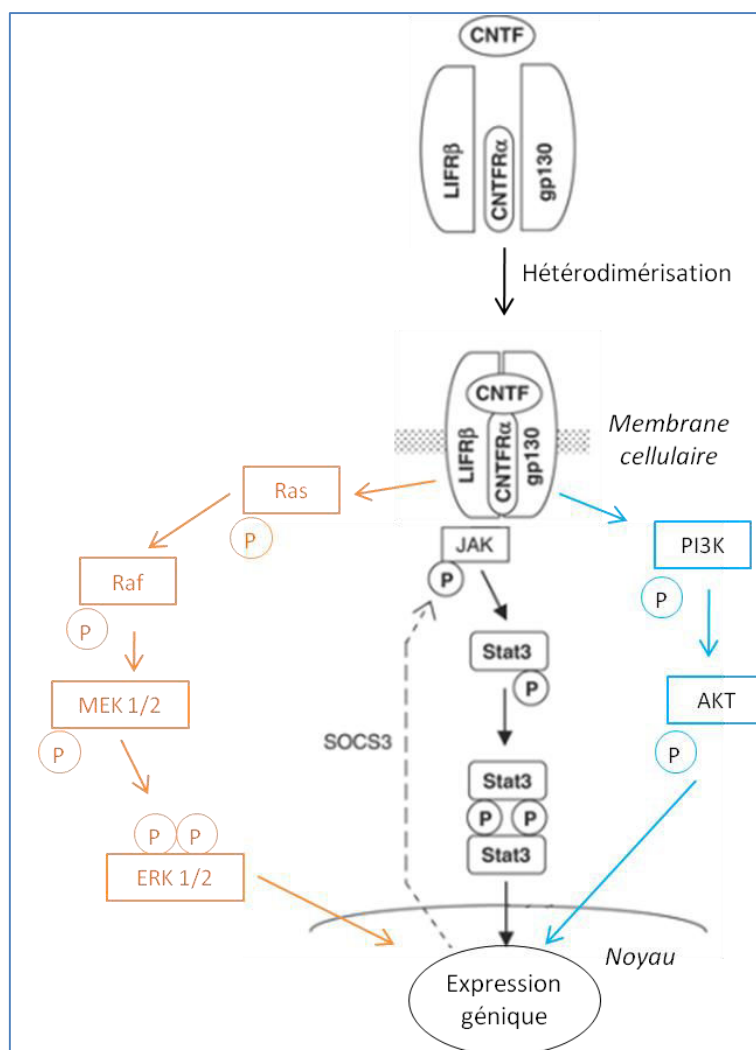


Figure 39 : Activation et signalisation du complexe CNTF-R après fixation de son ligand

(d'après Suzuki et al., 2009)

Le rapprochement des sous-unités LIFR β et gp130 entraîne l'activation des protéines JAK, constitutivement associées aux sous-unités transductrices, qui phosphorylent alors les tyrosines des domaines intracellulaires du récepteur. La phosphorylation des tyrosines entraîne le recrutement de protéines cytosoliques possédant un domaine SH2 (Src Homology domain 2) dont les protéines STAT qui sont activées par phosphorylation, ce qui entraîne leur dimérisation. Celle-ci permet la translocation des STAT vers le noyau, où ils induisent la transcription des gènes cibles, dont certains répresseurs de l'activité kinase des JAK (SOCS, Suppressor Of Cytokine Signaling), qui induisent un rétrocontrôle négatif. La voie JAK_{1/2}-STAT₃, indiquée en noir et en gras est la voie de transduction majoritaire. Les voies PI3K-AKT/PKB et ERK1/2 indiquées en bleu et orange sont deux voies secondaires également induites.

Le CNTF et l'activation de son récepteur nous ont semblé représenter une cible thérapeutique valide et bien caractérisée pour la MA et son utilisation en tant que modèle pour évaluer l'influence du vieillissement et/ou des troubles analogues sur sa fonctionnalité nous a paru pertinente. Nous nous sommes basés sur le fait que la signalisation induite par le CNTF implique un récepteur membranaire spécifique dont l'activité est sensible à l'organisation des rafts. Il semble donc raisonnable et pertinent de considérer que la réponse neuronale au CNTF puisse être affectée par des altérations de la composition lipidique comme celles issues des dyslipidémies associées au vieillissement ou en conséquence d'un déséquilibre de l'apport lipidique alimentaire.

C. Effets du vieillissement biologique sur la réponse cérébrale au CNTF

1. Démarche expérimentale

L'impact du vieillissement biologique sur la réponse cérébrale au CNTF a été examiné sur deux groupes de souris C57Bl/6J sauvages mâles. Le premier composé de souris âgées de 6 mois constitue le groupe témoin adulte jeune. Le second groupe se compose de souris modèles de vieillissement sans pathologie âgées de 18 mois. La fonctionnalité du récepteur du CNTF a été évaluée après une injection stéréotaxique icv d'une solution de CNTF (1 μ L à 44 μ M) ou d'une solution saline (véhicule). L'hippocampe a ensuite été isolé pour mesurer les niveaux de phosphorylation des protéines impliquées dans la signalisation induite par le CNTF (STAT₃, ERK_{1/2}). Ces mesures ont été réalisées en suivant une cinétique allant de 1 à 6 h. L'ensemble des résultats obtenus est présenté relativement à la variation de phosphorylation mesurée dans le groupe témoin adulte jeune en réponse au CNTF.

2. Impact de l'âge sur la cinétique de réponse au CNTF

Les trois sous-unités du complexe CNTF-R sont indispensables à l'activation de la signalisation. Dans un premier temps, une analyse par immunoblot a permis d'étudier l'influence du vieillissement sur les taux protéiques de ces sous-unités dans l'hippocampe des souris (Figure 40). Aucune différence significative entre les deux groupes de souris n'a été observée pour aucune des sous-unités, LIFR β ($p = 0,1838$), gp130 ($p = 0,5104$) et CNTFR α ($p = 0,3698$). Au cours du vieillissement, il a été décrit que le taux de CNTF libéré suite à une lésion corticale était diminué chez le rat (Needels *et al.*, 1985). Ce résultat a été confirmé par d'autres études animales. En effet, le CNTF participe à la survie des neurones moteurs et réduit l'atrophie induite par une dénervation des muscles squelettiques. La mesure de la production de CNTF dans le nerf sciatique est corrélée à la performance musculaire développée par les animaux. Des expériences réalisées sur des rats ont ainsi montré une diminution de moitié du taux d'ARNm et de protéine CNTF dans des extraits de nerf sciatique de rats âgés de 24 mois en comparaison à des rats âgés de 6 mois. Cette réduction a été associée à une surexpression de la sous-unité CNTFR α du récepteur sans modification des expressions de LIFR β et gp130 (Guillet *et al.*, 1999). Une étude chez les femmes âgées de 25 à 104 ans a montré que le taux sérique de la forme soluble de gp130 n'est altéré qu'après 80 ans (Giuliani *et al.*, 2001), tandis que l'expression de LIFR β n'est pas modifiée dans l'hippocampe et le cortex de patients atteints de MA (Soilu-Hänninen *et al.*, 2010). Une analyse transcriptomique du tissu cortical d'individus décédés accidentellement à l'âge moyen de 42 ans a quant à elle révélé une hausse de l'ARNm du CNTFR α pour les porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E4 (Conejero-Goldberg *et al.*, 2011). L'ensemble des données obtenues chez l'homme et l'animal suggère que seule l'expression du CNTF serait atténuée au cours du vieillissement, tandis que celle de son récepteur serait inchangée pour les sous-unités gp130 et LIFR β , voire spécifiquement augmentée pour la sous-unité CNTFR α dans le cadre d'une pathologie. Les résultats que nous avons obtenus corroborent donc les données de la littérature.

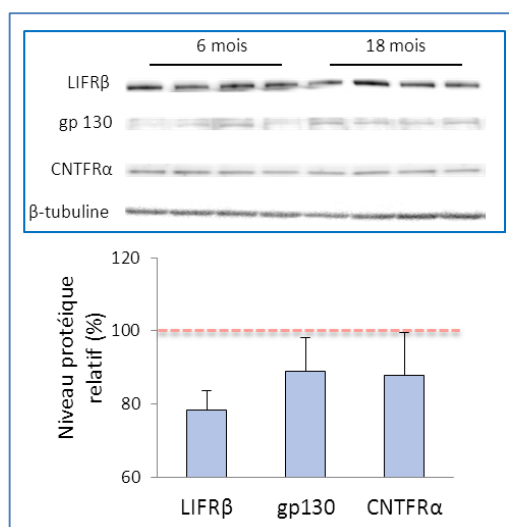


Figure 40 : Effets de l'âge sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans l'hippocampe des souris

Le niveau relatif des protéines LIFRβ, gp130 et CNTFRα évalué par analyse densitométrique des immunoblots a été normalisé par rapport à la β-tubuline, et comparé au niveau protéique relatif calculé au sein du groupe de souris âgées de 6 mois utilisé comme référence et représenté par la ligne pointillée à 100%. Les valeurs représentées sont les moyennes ± SEM par groupe (N = 6).

Le CNTF agit par l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire qui nécessitent la phosphorylation de STAT₃ et ERK_{1/2}. Afin de caractériser l'effet du vieillissement sur l'activité du complexe CNTF-R, les niveaux de phosphorylation des protéines impliquées ont été mesurés dans l'hippocampe des souris. En réponse au CNTF, ces kinases sont rapidement activées par phosphorylation transitoire, ce qui nous a conduits à évaluer leur état de phosphorylation 1 h, 3 h et 6 h après exposition au CNTF. Les effets du CNTF sont majoritairement dépendants de l'activation de la voie STAT₃. En effet, l'inhibition spécifique de STAT₃ prévient les effets trophiques du CNTF (Sango *et al.*, 2008). Des expériences *in vitro* corrélant la concentration de CNTF avec la proportion de STAT activé démontrent notamment une activation préférentielle de STAT₃ par rapport à STAT₁ pour des doses de l'ordre du picomolaire (Kaur *et al.*, 2002). La première observation concerne la rapidité avec laquelle le CNTF active la voie de STAT chez les souris âgées de 6 et 18 mois (Figure 41).

Comme le montre la figure 41B, l'activation de la voie de STAT₃, évaluée à partir du degré de phosphorylation de cette protéine, est très importante pour les souris âgées de 6 mois, avec des taux de P-STAT₃ 30 fois plus élevées environ au maximum observé 1 h après l'injection de CNTF. Cette activation persiste au-delà de 6 h mais se stabilise à un niveau de phosphorylation plus faible (environ 18 fois) à partir de 3 h. Chez les souris de 18 mois, l'activation est réelle, mais significativement différente. Elle décrit un pic moins marqué (10 fois) et plus tardif (3 h après l'injection de CNTF) que chez les souris de 6 mois. L'activation persiste au-delà de 6 h mais à un niveau plus faible. La figure 41C a été réalisée en considérant comme référence le niveau de phosphorylation de STAT₃ des souris âgées de 6 mois, représenté par la ligne en pointillé à 100%. Le taux de phosphorylation après injection de CNTF se distingue très clairement entre les deux groupes de souris, une différence significative est observée dès 1 h. En effet, celui-ci est réduit de

près de 50% ($p = 0,0107$) lors du pic d'activation 1 h après l'injection, puis diminué d'environ 40% à 3 h ($p = 0,0175$) et 6 h ($p = 0,0487$). La transduction du signal induit par le CNTF dans l'hippocampe est donc significativement plus faible chez les souris de 18 mois que chez les souris de 6 mois.

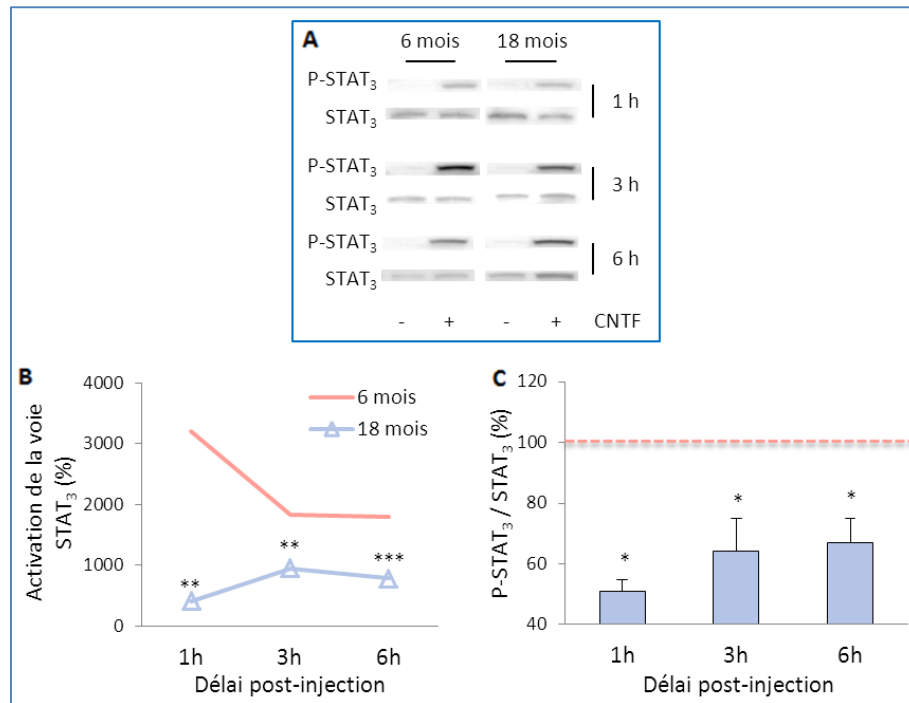


Figure 41 : Effets de l'âge sur la cinétique d'activation par le CNTF de la voie de transduction de STAT₃ dans l'hippocampe des souris

Les proportions des formes phosphorylées P-STAT₃ ont été normalisées par rapport aux teneurs totales de protéines STAT₃, phosphorylées et non, évaluées par analyse densitométrique des immunoblots. L'activation des voies a été mesurée en prenant en compte la différence de ces proportions entre les souris ayant subi l'injection de solution véhicule et celles ayant subi l'injection de CNTF. La figure C a été réalisée en exprimant les taux relatifs de P-STAT₃ chez les souris de 18 mois comparativement à ceux des souris de 6 mois considérés comme références et représentés par la ligne pointillée à 100%. Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe (N = 3). La significativité des différences calculées entre les deux groupes âges à chaque délai post-injection est donnée par * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

Bien que l'axe JAK-STAT soit prépondérant dans les effets du CNTF, l'activation des protéines JAK permet également l'induction de la voie de signalisation d'ERK. En réponse au CNTF, JAK₁ entraîne le recrutement et la phosphorylation du domaine SHP2 de gp130 et la phosphorylation directe de Gab1 (*Grb Associated Binder*) (Takahashi-Tezuka *et al.*, 1998). L'association de ces formes phosphorylées à p85, la sous-unité régulatrice de la PI3K, provoque une levée de l'inhibition de l'activité de la sous-unité catalytique p110 de la PI3K (Yu *et al.*, 1998). Finalement, l'activation de la PI3K par le CNTF est essentielle dans l'activation de la voie d'ERK (Müller *et al.*, 2009 ; Steinberg *et al.*, 2009). L'activation de la voie d'ERK_{1/2} a donc été étudiée en suivant la même approche que pour celle de STAT₃ (Figure 42).

L'activation de la voie d'ERK_{1/2} est apparue plus modérée que celle de STAT₃. Comparativement au niveau de phosphorylation des kinases des souris de 6 mois considéré comme référence et représenté par la ligne pointillée à 100%, l'activation de la voie d'ERK_{1/2} apparaît 6 h après l'injection de CNTF chez les souris de 18 mois, alors qu'elle est maximale 3 h après chez les souris de 6 mois (Figures 42A et 42B). Cette activation semble décalée dans le temps, puisque c'est 6 h après l'injection de CNTF qu'elle est remarquable

dans l'hippocampe des souris de 18 mois et qu'aucune différence significative ne peut être décelée avec le groupe des souris âgées de 6 mois pour ce temps (Figure 42C). Pour la suite des expérimentations, nous n'avons conservé que l'étude des voies de STAT₃ et ERK_{1/2}, 3 h après l'injection de CNTF. Cette cinétique permet une activation mesurable et sensible des voies de signalisation de STAT et ERK pour rendre compte d'une comparaison entre les différents groupes étudiés et est compatible avec le délai nécessaire pour récupérer les structures cérébrales souhaitées après injection.

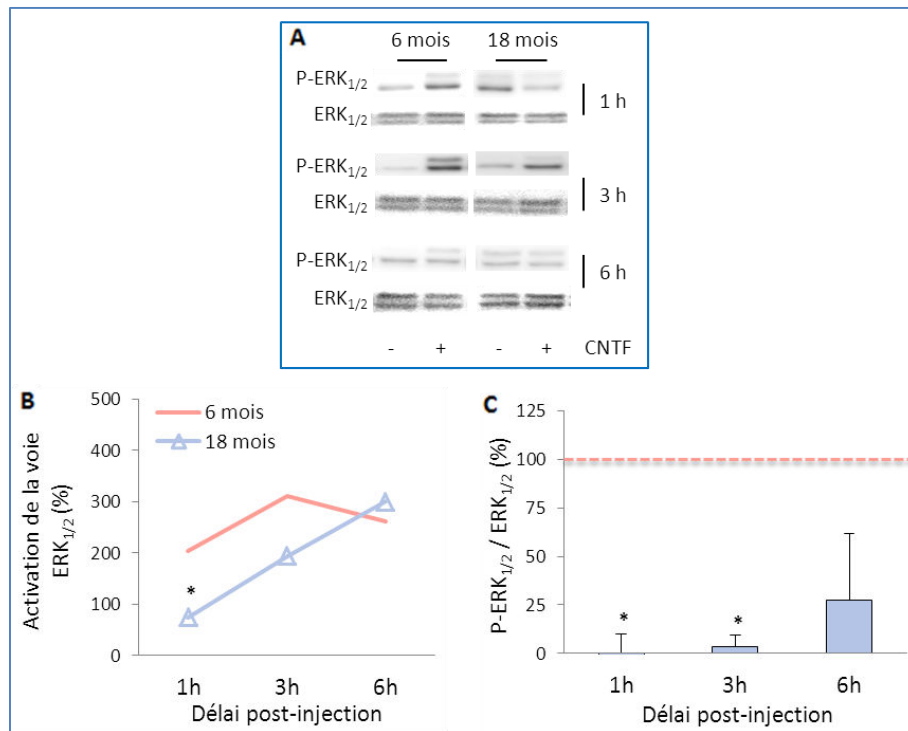


Figure 42 : Effets de l'âge sur la cinétique d'activation par le CNTF de la voie de transduction d'ERK_{1/2} dans l'hippocampe des souris

Les proportions des formes phosphorylées P-ERK_{1/2} ont été normalisées par rapport aux teneurs totales de protéines ERK_{1/2}, phosphorylées et non, évaluées par analyse densitométrique des immunoblots. L'activation des voies a été mesurée en prenant en compte la différence de ces proportions entre les souris ayant subi l'injection de solution véhicule et celles ayant subi l'injection de CNTF. La figure C a été réalisée en exprimant les taux relatifs de P-ERK_{1/2} chez les souris de 18 mois comparativement à ceux des souris de 6 mois considérés comme références et représentés par la ligne pointillée à 100%. Les valeurs représentées sont les moyennes ± SEM par groupe (N = 3). La significativité des différences calculées entre les deux groupes âges à chaque délai post-injection est donnée par *p<0,05.

En conclusion, le CNTF induit majoritairement la voie de JAK₁/STAT₃ et plus minoritairement la voie d'ERK_{1/2}. Ces voies interconnectées sont également stimulées par d'autres facteurs, ce qui rend complexe l'étude de leur activation. Cependant, la stimulation par le CNTF semble induire une signalisation rapide qui pourrait être responsable de ces effets à court terme, mais induire également une signalisation sur la durée, persistant 6 h au moins après l'injection, ce qui pourrait être à l'origine de conséquences à plus long terme. Ces réactions pourraient bien être altérées par le vieillissement puisque même si la signalisation est fonctionnelle et que l'ensemble du complexe récepteur est exprimé dans le modèle de souris âgées de 18 mois, celui-ci présente un déficit de réponse comparé au groupe de souris de 6 mois.

Ces résultats apportent des arguments en faveur d'une altération progressive de cette cible thérapeutique dans le cerveau chez les individus âgés. Ils pourraient aussi être applicables à d'autres récepteurs et voies de signalisation impliqués dans le fonctionnement cérébral ou représentant d'autres cibles thérapeutiques potentielles. Plusieurs études antérieures ont d'ailleurs montré que le vieillissement conduit à des réponses anormales de différentes voies de signalisation impliquées dans les fonctions et la sensibilité neuronale. Les voies de signalisations induites par les neurotrophines ont été particulièrement étudiées, à la fois au cours du vieillissement et dans des pathologies neurodégénératives. En effet, les expressions des neurotrophines et de leurs récepteurs peuvent être modifiées dans plusieurs maladies, ce qui a une incidence sur leurs fonctions dans le SN central et périphérique. Les signaux intracellulaires activés par les neurotrophines sont déclenchés par la liaison à un récepteur Trk ou p75^{NTR} à la surface de la cellule (Twiss *et al.*, 2006). En général, les signaux émanant des récepteurs Trk favorisent la survie, la croissance et le renforcement synaptique, tandis que ceux provenant de p75^{NTR} induisent l'apoptose, atténuent la croissance synaptique et en affaiblissent la signalisation. Les neurotrophines matures sont le ligand préféré des protéines Trk tandis que p75^{NTR} les lie avec une affinité environ mille fois inférieure. Cependant, celui-ci fixe préférentiellement les pro-neurotrophines ou s'associe aux récepteurs TrkA et TrkB qui lient respectivement le NGF et le BDNF (Twiss *et al.*, 2006). Une étude sur les effets du vieillissement a montré que dans le cortex préfrontal et l'hippocampe de rats âgés, les niveaux de pro-NGF et de p75^{NTR} sont élevés de 1,6 à 1,9 fois tandis que la maturation du NGF et la quantité de son récepteur P-TrkA sont respectivement réduites de 36 à 44% et de 45 à 49% (Terry *et al.*, 2011). Ces résultats soutiennent l'argument selon lequel la signalisation du NGF est altérée dans le vieillissement cérébral. Une étude antérieure a d'ailleurs montré que le vieillissement du cerveau est caractérisé par des changements dans les quantités de récepteurs TrkA et p75^{NTR}, avec une augmentation progressive du niveau de p75^{NTR} et une diminution parallèle du taux d'expression de TrkA. Cette commutation de TrkA vers p75^{NTR} est accompagnée d'une modification dans la production des seconds messagers en faveur d'une cascade impliquant les céramides proapoptotiques (Costantini *et al.*, 2005). Il a par la suite été proposé que l'IGF-1 et son récepteur soient responsables de cette commutation dans une lignée de neuroblastome humain et dans des neurones primaires issus de cerveaux de souris. Ainsi, une hyperactivation du récepteur de l'IGF-1 entraînerait une forme accélérée de vieillissement chez la souris, caractérisée par une augmentation du déséquilibre TrkA/p75^{NTR}, ainsi que par une production accrue de peptide amyloïde dans le cerveau (Costantini *et al.*, 2006). De même, des altérations des niveaux d'expression du BDNF et de son récepteur TrkB ont été observées au cours du vieillissement. Des baisses significatives avec l'âge ont été détectées pour les ARNm et les protéines de BDNF et de TrkB dans de nombreuses régions cérébrales du rat. Ces résultats ont été corrélés avec l'état cognitif des animaux (Croll *et al.*, 1998). Plus tard, une étude sur l'hippocampe de rats soumis à différentes conditions de stress a confirmé que la régulation du BDNF et de TrkB est atteinte au cours du vieillissement (Shi *et al.*, 2010). Dans un modèle de rat Zitter, présentant une dégradation progressive des cellules neuronales et une encéphalopathie spongiforme avec l'âge, il a été montré une réduction de l'expression

du gène du BDNF dans le cervelet et le tronc cérébral, ainsi qu'une diminution de l'activité ERK_{1/2} impliquée par le BDNF (Muto *et al.*, 1999). Le récepteur de la NT-3 (neurotrophine 3), TrkC, voit également l'expression de son ARNm et de sa protéine modifiée au cours du vieillissement dans l'hypophyse (Kononen *et al.*, 1995). Chez la souris âgée de 24 mois, comparé aux souris de 3 et 12 mois, l'activité du récepteur du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) est réduite, atténuant en conséquence sa réponse angiogénique et ses effets sur la neurogenèse (Gao *et al.*, 2009). Ces perturbations décrites chez l'animal âgé sont exacerbées au cours de la MA et des altérations du transport rétrograde, de la synthèse, de la maturation, de la régulation et de l'activité des facteurs de croissance semblent contribuer aux processus neurodégénératifs et à l'évolution de la maladie (Murer *et al.*, 2001 ; Allen and Dawbarn, 2006 ; Heese *et al.*, 2006 ; Schulte-Herbrüggen *et al.*, 2008a).

Plusieurs autres kinases associées à des fonctions synaptiques ont également été décrites comme étant sensibles au vieillissement. En effet, les protéines kinases jouent un rôle stratégique visant à convertir les signaux extracellulaires en réponses biologiques. Des altérations fonctionnelles de ces kinases ou un déficit de leur signalisation peuvent donc directement entraîner des dysfonctionnements neuronaux dépendants de l'âge. Il a ainsi été montré que la PKC, la PKA, la protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante (CaMK) et la tyrosine kinase subissent des modifications lors du vieillissement (Govoni *et al.*, 2010). Il en est de même de la protéine STAT₃ dont la réduction du taux cérébral a été rapportée chez le rat de 26 mois, mais sans information néanmoins sur sa forme active. Dans des neurones matures maintenus en culture, l'activation de la signalisation par la voie de STAT₃ par le CNTF et d'autres facteurs de croissance ne semble pas perturbée (De-Fraja *et al.*, 2000). Au niveau périphérique, le vieillissement n'a pas d'effet sur la phosphorylation de STAT₃ dans les lymphocytes T (Fulop *et al.*, 2006), mais sa translocation dans le noyau est altérée dans le foie (Xu et Sonntag 1996). Une étude sur des patients atteints de MA relate une diminution d'un facteur 3 de l'immunoréactivité de P-STAT₃ dans le gyrus denté, suggérant une altération des voies de survie (Chiba *et al.*, 2009b). Une seconde étude montre, quant à elle, une augmentation transitoire importante des niveaux de P-STAT₃ en réponse à l'Aβ soluble, sans doute liée à des conditions inflammatoires, qui aboutit finalement à une diminution du taux de P-STAT₃ (Wan *et al.*, 2010). Quoi qu'il en soit, la voie de signalisation STAT₃ présente un déficit d'activation dans l'hippocampe de patient atteints de MA, ainsi que chez des souris transgéniques modèles de la pathologie. Ce déficit a pu être relié à la mise en place de troubles cognitifs chez la souris transgénique âgée de 14 mois (Chiba *et al.*, 2009a, 2009b). Nos résultats ainsi que ceux déjà publiés confirment donc clairement l'importance d'étudier et d'examiner l'impact du vieillissement sur la signalisation cellulaire et soulignent l'intérêt de concevoir de nouveaux modèles précliniques pertinents prenant en compte le facteur vieillissement pour le développement de futurs médicaments destinés au traitement des pathologies qui y sont associées. Ces informations deviennent indispensables dans la perspective d'essais thérapeutiques performants adressés aux personnes âgées, les patients atteints de MA en particulier. Au-delà de la description de ces anomalies, nous avons voulu contribuer à expliquer les mécanismes mis en jeu. N'ayant pas mis en évidence de

modification des niveaux protéiques des sous-unités du complexe récepteur CNTF-R, nous avons émis l'hypothèse que ce déficit de réponse au CNTF puisse résulter de remodelages membranaires fins. Ceux-ci affecteraient alors les capacités d'interaction entre les sous-unités et en conséquence empêcheraient le CNTF-R d'acquies sa structure quaternaire active.

D. Effets du vieillissement biologique sur la localisation membranaire cérébrale du CNTF-R

1. Démarche expérimentale

Comme nous l'avons indiqué précédemment, le complexe CNTF-R est un récepteur membranaire dont l'activation serait dépendante de sa localisation et de son endocytose. La composition lipidique des membranes pourrait donc jouer un rôle primordial dans la fonctionnalité du CNTF-R. Ainsi, la déstabilisation de leur architecture ou une modification de la distribution des microdomaines, notamment lors du vieillissement, pourrait empêcher la formation du complexe récepteur actif impliquant CNTFR α , LIFR β et gp130, et expliquerait les différences de réponse au CNTF observées précédemment. Afin d'analyser l'impact du vieillissement biologique sur le remodelage des microdomaines membranaires et de déterminer l'influence de leur organisation sur la localisation et les niveaux protéiques du CNTF-R, nous avons caractérisé et comparé les microdomaines des membranes extraites du cortex cérébral de souris âgées de 6 et 18 mois. Pour cela, un fractionnement membranaire sur un gradient continu de saccharose a été réalisé pour séparer les différents microdomaines résistants au détergent utilisé pour toutes les études de ce travail, le Triton X-100. Comme nous l'avons détaillé dans le paragraphe « Extraction et isolement des rafts » de la partie Introduction de cette thèse, le choix du détergent et de la méthode d'extraction détermine la nature et la composition des rafts, ce qui impose évidemment de ne comparer que des résultats obtenus selon cette même procédure. Chaque échantillon analysé a été extrait à partir du cortex cérébral entier des souris afin de disposer de matériel en quantité suffisante pour les analyses protéiques par immunoblot. Des études parallèles par microscopie confocale ont permis d'examiner la localisation subcellulaire des sous-unités du complexe CNTF-R ainsi que leur colocalisation dans les rafts corticaux.

2. Impact de l'âge sur la composition et la structure des microdomaines membranaires

Le regroupement des flotillines en cluster au sein des membranes représente un élément déterminant de la formation des rafts dont elles constituent des marqueurs très largement utilisés dans la littérature (Pike, 2004). Des fractions de densité différente ont été isolées après ultracentrifugation des membranes du cortex cérébral et les différentes fractions ont été identifiées par immunoblot grâce à des marqueurs spécifiques des régions ordonnées, comme la flotilline-1 marqueur des rafts, et des régions

fluides, comme le récepteur de la transferrine ou rTf (Pike, 2003, 2004). Le cholestérol, particulièrement abondant dans les rafts, a également été dosé dans ces fractions. Les sous-populations de rafts ont donc été considérées correspondre aux fractions contenant les niveaux maximaux de flotilline-1 et de cholestérol. Dans un premier temps, nous avons remarqué que dans le groupe de souris âgées de 18 mois, la quantité totale de cholestérol présente dans l'ensemble des fractions membranaires obtenues après ultracentrifugation est significativement supérieure ($+122 \pm 17\%$, $p = 0,0002$, Figure 43) à celle des souris témoins adultes jeunes. Ces résultats suggèrent donc que le vieillissement puisse modifier la composition locale des membranes en cholestérol. Une autre étude a d'ailleurs aussi permis d'observer une redistribution dynamique du cholestérol dans les membranes cérébrales lors du vieillissement (Marquet-de Rougé *et al.*, 2013) tandis que plusieurs autres recherches ont fait état d'une modification très variable de ce lipide selon la zone du cerveau observée (Sodero *et al.*, 2011a, 2011b). Par ailleurs, dans un modèle de souris hétérozygote pour le récepteur LSR (*Lipolysis Stimulated lipoprotein Receptor*), caractérisé par une dyslipidémie mais aussi par des changements de l'homéostasie du cholestérol dans le cerveau âgé et par une désorganisation morphologique des membranes cérébrales, nous avons montré que la réduction de l'expression du gène *lsr* rend les souris plus sensibles au stress amyloïde. En effet, les modifications morphologiques des membranes cérébrales chez les souris *lsr*^{+/-} associées à une altération du métabolisme du cholestérol pourraient être impliquées dans la sensibilité accrue de ces souris au stress amyloïde lors du vieillissement (Pinçon *et al.*, 2015). L'augmentation de la teneur membranaire en cholestérol dans le cortex des souris pourrait ainsi refléter une atteinte cérébrale associée au vieillissement.

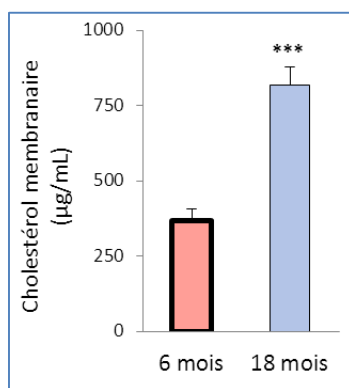


Figure 43 : Effets de l'âge sur la teneur en cholestérol des membranes corticales des souris

Pour chaque souris, la teneur en cholestérol mesurée dans les fractions membranaires obtenues après ultracentrifugation a été compilée. Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe ($N = 6$). La significativité des différences calculées entre les deux groupes régimes est donnée par *** $p < 0,001$.

Dans un second temps, nous avons observé que dans le groupe de souris témoins adultes jeunes, trois fractions principales riches en flotilline-1 et en cholestérol ont été identifiées, correspondant à une sous-population de rafts de haute densité ségréguée dans les fractions à 30-40% de saccharose (Figures 44A et 44B). En revanche, dans le groupe de souris âgées de 18 mois, une seule fraction riche en flotilline-1 et en cholestérol se démarque, correspondant à une sous-population de rafts de plus faible densité présente

dans la fraction à 20% de saccharose (Figures 44C et 44D). En superposant schématiquement la répartition des rafts des deux groupes de souris en fonction du gradient de saccharose, la figure 44E montre que les souris de 6 mois présentent toutes une sous-population de rafts de haute densité, tandis que les souris de 18 mois montrent une répartition entre deux sous-populations de rafts, l'une majoritaire de faible densité et une autre de plus haute densité identifiée chez deux souris du groupe. Ces différentes fractions riches en flotilline-1 et en cholestérol, correspondent à des microdomaines distincts, de densités différentes, illustrant l'hétérogénéité des structures membranaires évoquées. Ces microdomaines présentent un rapport protéines/lipides élevé en raison de leur rôle de points d'ancrage au cytosquelette et les différences de densité peuvent s'expliquer notamment par la présence de protéines du cytosquelette comme la myosine, l' α -actine ou la vimentine. Ces plateformes permettraient ainsi une relation dynamique entre les microdomaines membranaires et le cytosquelette, autorisant le remodelage et la redistribution de portions de membranes riches en cholestérol (Mukherjee and Maxfield, 2000 ; Nebl *et al.*, 2002 ; Pike, 2003, 2004). Les résultats obtenus suggèrent néanmoins que le vieillissement influence les propriétés biophysiques des membranes en induisant des mécanismes de remodelage caractérisés par une disparition des rafts de haute densité au profit de rafts de plus faible densité (Figure 44C). Le vieillissement semble donc modifier non seulement la distribution des rafts, mais aussi très probablement leur composition.

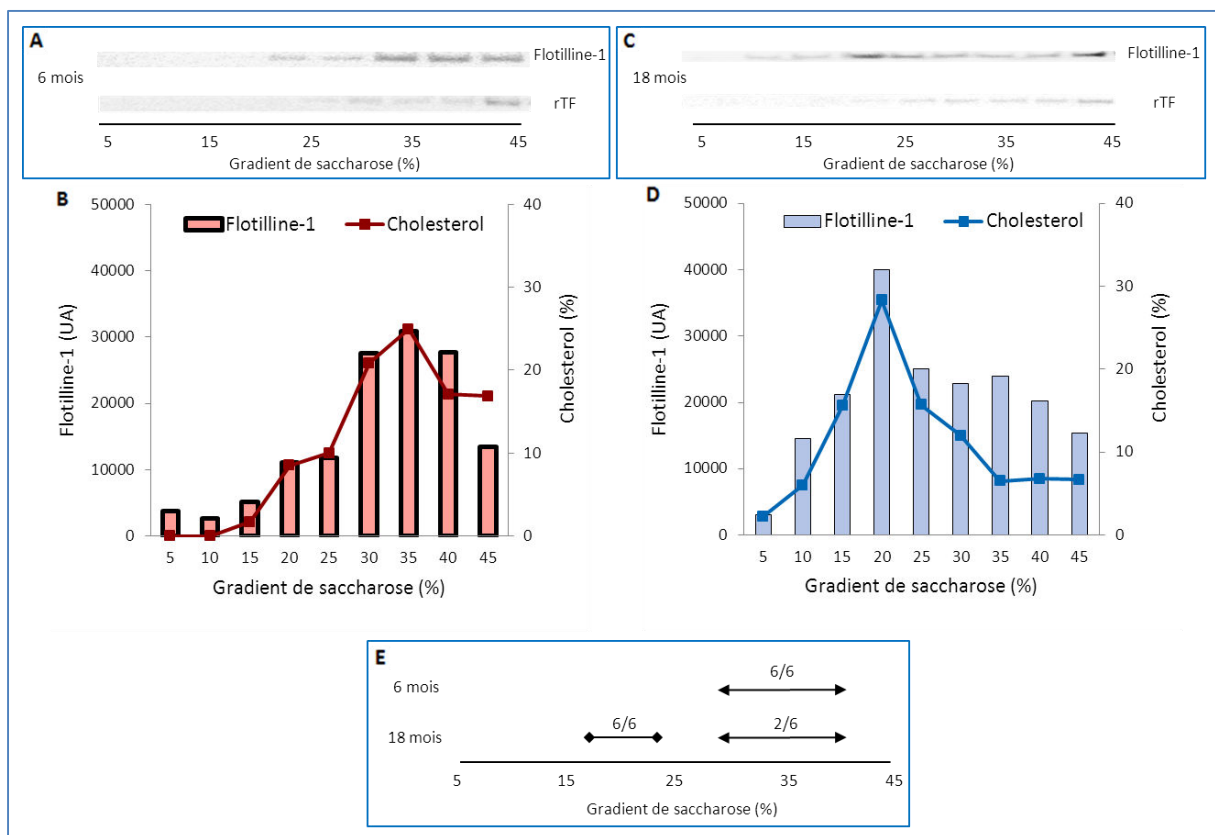


Figure 44 : Effets de l'âge sur la répartition des microdomaines membranaires de cortex des souris

Les profils présentés correspondent à un échantillon des extraits membranaires corticaux représentatifs des groupes de souris de 6 et 18 mois (N = 6). Le niveau de cholestérol dans chaque fraction a été rapporté à la quantité totale de toutes les fractions confondues et est exprimé en pourcentage.

Une autre étude, utilisant aussi le Triton X-100 comme détergent et un gradient de saccharose pour le fractionnement membranaire, a décrit une modification des rafts au cours du vieillissement, avec notamment la redistribution du cholestérol et l'apparition de cavéoline-1 dans les rafts de cortex cérébral et d'hippocampe de souris âgées de 24 mois (Marquet-de Rougé *et al.*, 2013). Cependant, contrairement à nos résultats, les rafts de haute densité étaient en proportions plus importantes chez les souris âgées que chez les souris jeunes. Néanmoins, dans ce cas aussi, le vieillissement influence les propriétés biophysiques des rafts en changeant la dynamique de leur structure et en provoquant une certaine hétérogénéité. Une autre étude a rapporté une altération significative de la distribution des protéines dans les rafts extrait de membranes synaptiques du cerveau de rats âgés de 34 mois comparés à des rats de 5 mois (Jiang *et al.*, 2010). Dans les préparations de tissus âgés, il a notamment été retrouvé une diminution de l'expression de protéines synaptiques comme la synapsine-2, des capacités antioxydantes avec les ubiquinones, des protéines du cytosquelette comme l'actine ou la tubuline et une augmentation de l'expression de la protéine GFAP.

De façon très intéressante, une redistribution de la protéine APP dans les rafts chez les rongeurs a également été exposée lors du vieillissement, ce qui pourrait influencer le développement d'une MA (Marquet-de Rougé *et al.*, 2013). D'ailleurs, dans le cortex de souris transgéniques 3xTgAD modèles de MA modélisant l'accumulation de protéines Tau et de peptide A β dans le cerveau, il a été décrit une augmentation de la teneur en flotilline-1 dans les rafts de faible densité par rapport à des souris sauvages témoins C57Bl/6J de 8 et 16 mois (Chadwick *et al.*, 2010). Les profils de diverses protéines ont été comparés dans les rafts de ces groupes de souris témoins âgées de 16 mois par rapport aux modèles de MA, et seulement 17% des protéines ont été identifiées comme présentes en commun. Cependant, plusieurs de ces protéines communes comme IRS-1, caspase-7, IGF-1R, ou mTOR ont été détectées à des taux différents. Des voies de signalisation sont aussi modifiées et les plus fortes différences concernent une moins bonne activation, chez les souris transgéniques, des signalisations liées aux facteurs de croissance PDGF, EGF et FGF (*Fibroblast Growth Factor*), ou aux récepteurs synaptiques de la neuréguline et du glutamate. La combinaison d'analyses protéomiques et informatiques a permis d'identifier des corrélations importantes entre l'expression de protéines fonctionnelles dans les rafts et la physiopathologie de la MA (Chadwick *et al.*, 2010). Chez l'homme, une étude a décrit une stabilité de la composition lipidique des rafts au cours du vieillissement sur un échantillon de personnes de 24 à 85 ans (Marin *et al.*, 2013), bien qu'ait été observé une atteinte des composants des rafts dans le cortex de patients atteint de MA avec notamment une perte importante d'AGPI *n*-3, ainsi qu'une diminution du cholestérol, de la SM et des AGS (Marin *et al.*, 2013; Fabelo *et al.*, 2014). Les perturbations de cette composition dans le cerveau de patients atteints de MA affecte l'architecture des rafts, ce qui peut expliquer les altérations de signalisation observées dans la MA (Marin *et al.*, 2013). En effet, une conséquence possible des modifications des propriétés physicochimiques des rafts est le risque de perturber la dynamique des interactions entre les protéines des rafts, en particulier celles impliquées dans le traitement de l'APP. Ainsi, il a été décrit que la protéine BACE est augmentée dans

les rafts des cerveaux de patients atteints de MA, ce qui accroît son interaction avec APP dès les premiers stades de la pathologie (Fabelo *et al.*, 2014). L'altération de la matrice lipidique des rafts peut en affecter significativement les propriétés physicochimiques et fournir un microenvironnement propice au vieillissement et au développement de pathologies comme la MA. Dans cette même logique, ces atteintes pourraient aussi être défavorables à l'action de molécules thérapeutiques en modifiant leurs cibles membranaires.

3. Impact du remodelage membranaire lié à l'âge sur le complexe CNTF-R

Les résultats exposés dans les paragraphes précédents démontrent que la perte de signalisation du CNTF constatée chez les souris âgées de 18 mois ne peut être expliquée par une réduction des niveaux d'expression des sous-unités gp130, LIFR β et CNTFR α . Nous émettons donc l'hypothèse que le défaut de réponse du récepteur du CNTF pourrait être dû à une association plus difficile du complexe actif en conséquence du remaniement des rafts par le vieillissement. Afin d'étudier la localisation de ces sous-unités dans les rafts du cortex cérébral, une analyse d'immunomarquage par DuoLink[®] a été réalisée sur des coupes de cerveau de souris âgées de 6 et de 18 mois. Cette technique permet de mettre en évidence une proximité physique entre deux protéines par l'apparition d'un spot fluorescent, témoin d'une colocalisation effective des protéines visées, et dont le nombre sur un champ microscopique peut être défini à l'aide du logiciel ImageJ.

Nous avons tout d'abord comparé le niveau global de chaque sous-unité du complexe CNTF-R et de la flotilline-1 dans le cortex des souris des deux groupes, évalué par immunoblot dans les extraits membranaires totaux avant séparation par ultracentrifugation en gradient de saccharose. Ceci nous a permis de constater l'absence de différence significative liée à l'âge (Figure 45) pour LIFR β ($p = 0,8405$), CNTFR α ($p = 0,9941$) et la flotilline-1 ($p = 0,8095$).

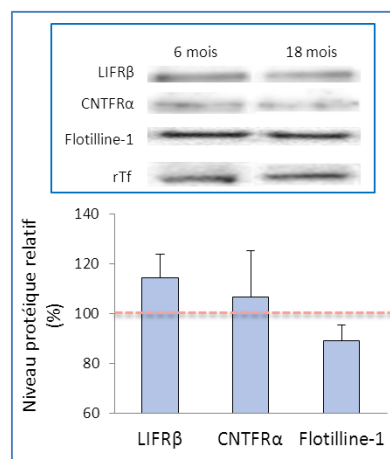


Figure 45 : Effets de l'âge sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans les membranes corticales des souris

Le niveau relatif des protéines LIFR β , CNTFR α et flotilline-1 évalué par analyse densitométrique des immunoblots a été normalisé par rapport au récepteur de la transferrine et comparé au niveau protéique relatif calculé au sein du groupe de souris de 6 mois utilisé comme référence et considéré égal à 100%. Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe (N = 6).

Nous avons ensuite étudié la colocalisation des sous-unités du complexe CNTF-R l'une par rapport aux autres et cherché à établir si un défaut de formation du complexe CNTF-R actif pouvait expliquer l'anomalie de signalisation préalablement observée (Figure 46).

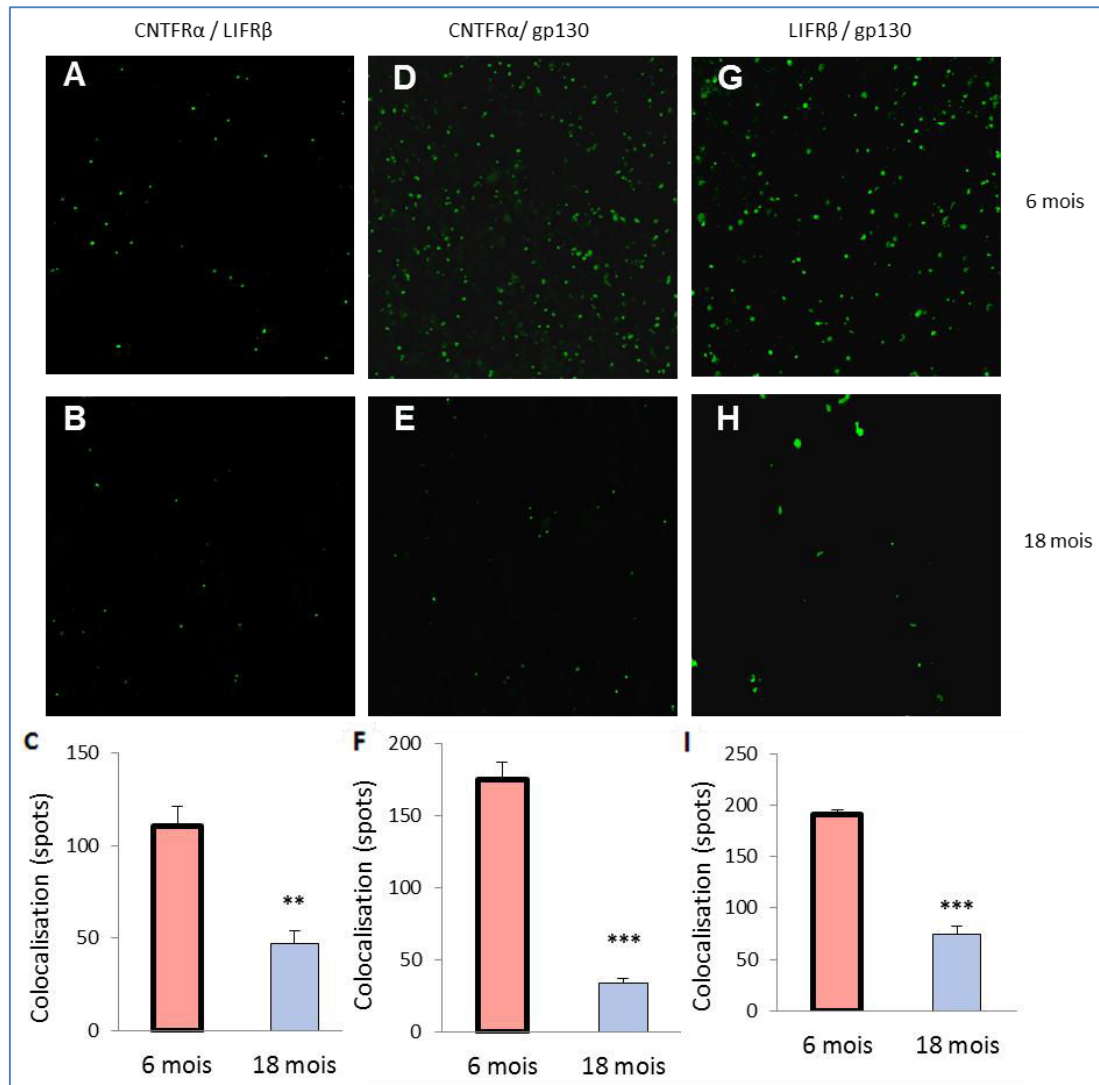


Figure 46 : Effets de l'âge sur la colocalisation des sous-unités du CNTF-R dans le cortex cérébral des souris

*Les clichés présentés sont représentatifs des groupes de souris de 6 et de 18 mois. Les résultats quantitatifs ont été calculés à partir de six déterminations par souris. Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe (N = 4). La significativité des différences calculées entre les deux groupes âges est donnée par **p<0,01 et ***p<0,001.*

Nous avons pu observer que les colocalisations entre les sous-unités gp130, LIFR β et CNTFR α sont considérablement réduites dans le cerveau des souris âgées de 18 mois par rapport à celles dénombrées dans le cerveau des souris de 6 mois. En effet, nous avons observé que chaque sous-unité, CNTFR α , LIFR β ou gp130 colocalise fortement avec chacune des deux autres dans le cortex des souris de 6 mois, ce qui suggère que les sous-unités du récepteur du CNTF soient ségréguées dans un environnement proche dans les membranes corticales des souris jeunes (Figures 46A, 46D et 46G). Par contre, une forte diminution du signal fluorescent DuoLink[®]a été observée dans le cerveau des souris âgées (Figures 46B, 46E et 46H),

témoignant d'une situation significativement modifiée. Les figures 46C, 46F et 46I proposent une quantification des différences à partir du nombre de spots fluorescents correspondant à chacune des analyses de colocalisation et démontrent une diminution des colocalisations CNTFR α -LIFR β (-57%, $p = 0,0011$), CNTFR α -gp130 (-80%, $p < 0,0001$) et LIFR β -gp130 (-61%, $p < 0,0001$) dans le cortex des souris de 18 mois en comparaison aux souris de 6 mois.

Nos résultats démontrent que si les trois sous-unités du complexe récepteur du CNTF sont regroupées dans le même environnement proche dans le cerveau de la souris jeune, leur colocalisation est grandement diminuée dans celui de la souris âgée, ce qui corrèle avec la diminution de la signalisation du CNTF précédemment observée. Le défaut de réponse du récepteur du CNTF pourrait ainsi être lié à un défaut d'association du complexe actif. Pour valider cette hypothèse, nous avons ensuite étudié la localisation entre la flotilline-1, protéine spécifique des rafts, et les sous-unités du complexe CNTF-R. Nous avons pu observer que les colocalisations gp130-flotilline-1, LIFR β -flotilline-1 et CNTFR α -flotilline-1 dans le cortex cérébral sont nombreuses chez les souris de 6 mois, ce qui situe préférentiellement les sous-unités du récepteur du CNTF dans les rafts comme en témoignent les signaux fluorescents DuoLink® verts visibles sur les clichés des figures 47A, 47D et 47G. Cette observation confirme la fonction de plateforme de signalisation attribuée aux rafts. Offrant le microenvironnement favorable à la ségrégation des protéines partenaires, les rafts s'avèrent capables d'héberger des complexes multiprotéiques fonctionnels appelés signalosomes capables de transduire efficacement les signaux chimiques transitant à proximité. Dans le cortex cérébral des souris de 18 mois en revanche, les signaux de colocalisation avec la flotilline-1 sont significativement moins nombreux (Figures 47B, 47E et 47H), suggérant que les sous-unités gp130, LIFR β et CNTFR α aient été exclues des rafts en conséquence du remodelage des microdomaines membranaires opéré lors du vieillissement. Les spots de colocalisation ont été dénombrés et les quantifications illustrées par les figures 47C, 47F et 47I démontrent la diminution significative des colocalisations gp130-flotilline-1 (-56%, $p = 0,0098$), LIFR β -flotilline-1 (-83%, $p < 0,0001$) et CNTFR α -flotilline-1 (-89%, $p < 0,0001$) dans le cortex cérébral des souris de 18 mois comparativement aux souris de 6 mois. Ces résultats démontrent donc assez clairement que les rafts des membranes corticales âgées ne semblent plus pouvoir assurer l'environnement approprié pour assurer la coségrégation des protéines censées interagir pour composer des signalosomes fonctionnels.

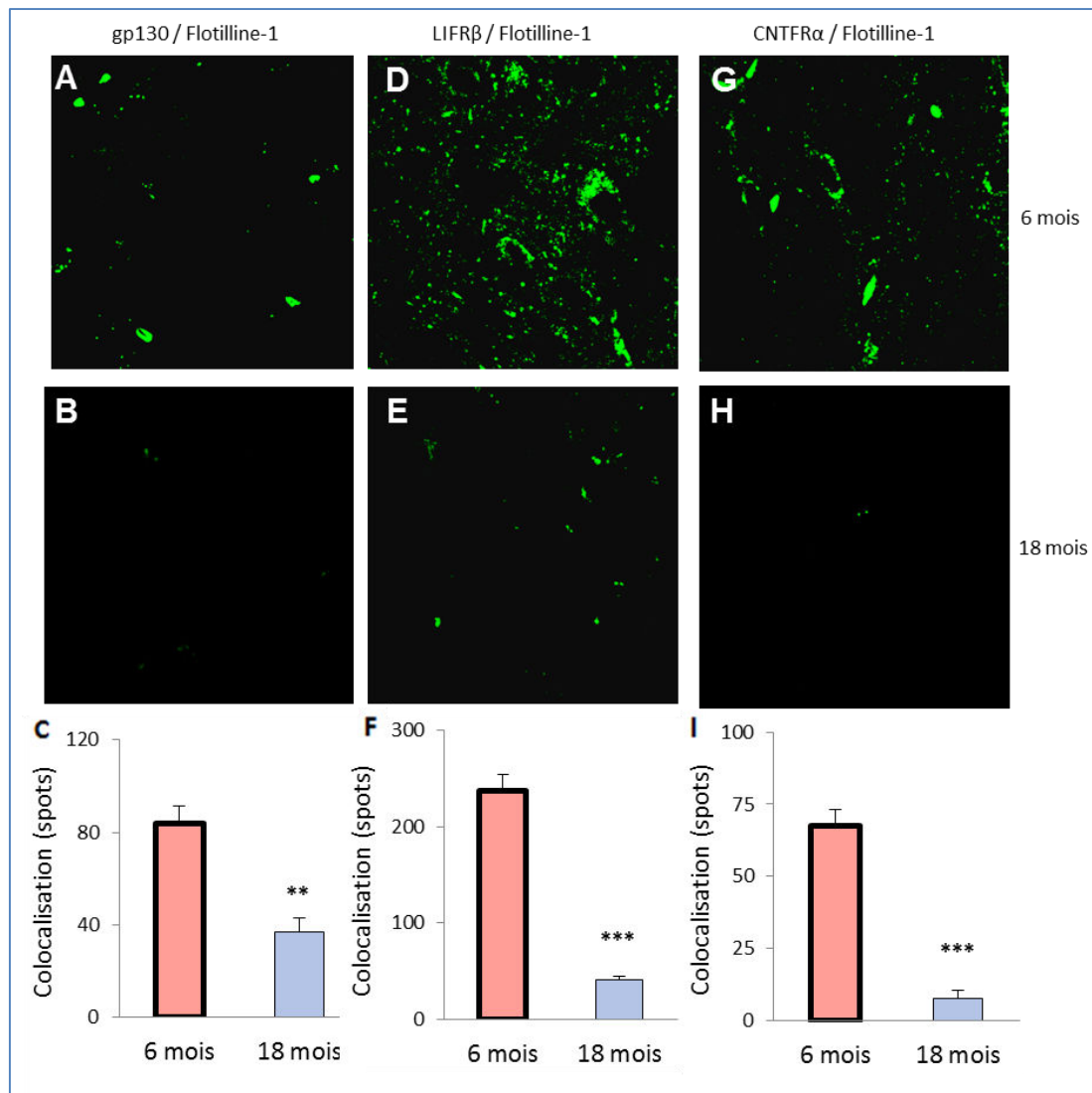


Figure 47: Effets de l'âge sur la colocalisation des sous-unités du CNTF-R dans les rafts corticaux des souris

Les clichés présentés sont représentatifs des groupes de souris de 6 et de 18 mois. Les résultats quantitatifs ont été calculés à partir de six déterminations par souris. Les valeurs représentées sont les moyennes ± SEM par groupe (N = 4). La significativité des différences calculées entre les deux groupes âges est donnée par ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

Les résultats précédents ont été confirmés par immunoblot sur les fractions identifiées comme des rafts pour les souris des deux groupes. Les niveaux des sous-unités LIFRβ et CNTFRα du complexe CNTF-R ont été calculés après quantification de l'intensité des signaux mesurés sur les immunoblots (Figure 48A), en prenant comme témoins les niveaux des souris de 6 mois considérés à 100%. Les rafts des souris âgées de 18 mois présentent des taux de LIFRβ (-41%, $p = 0,0407$) et CNTFRα (-59%, $p = 0,0014$) significativement plus faibles que ceux des souris âgées de 6 mois (Figures 48B et 48C). Ces résultats sont d'autant plus intéressants que nous avons démontré l'absence d'effet de l'âge sur les niveaux de ces protéines dans les fractions membranaires, renforçant l'idée d'une relocalisation lors du vieillissement. Il faut noter que la technique adoptée n'a pas permis de détecter gp130 dans les rafts, certainement en raison d'un niveau trop faible. Nos résultats valident donc l'hypothèse selon laquelle le vieillissement cérébral est associé à un déplacement des sous-unités gp130, LIFRβ et CNTFRα hors des rafts, sans modification du niveau d'expression.

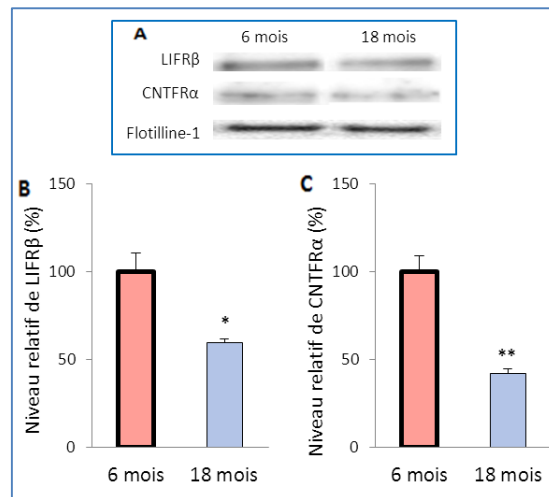


Figure 48: Effets de l'âge sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans les rafts corticaux des souris

Le niveau relatif des protéines LIFRβ et CNTFRα évalué par analyse densitométrique des immunoblots a été normalisé par rapport à la flotilline-1 et comparé au niveau protéique relatif calculé au sein du groupe de souris âgées de 6 mois utilisé comme référence et considéré égal à 100%. Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe (N = 6). La significativité des différences calculées entre les deux groupes âges est donnée par *p<0,05 et **p<0,01.

En conclusion, nos résultats montrent que le vieillissement altère la signalisation cérébrale du CNTF et la fonctionnalité cérébrale de son récepteur. Ces perturbations sont liées, au moins en partie, à une modification de la composition et de l'organisation des microdomaines membranaires, à l'origine d'un remaniement protéique au sein des rafts. Lors du vieillissement, les sous-unités du complexe récepteur CNTF-R subiraient une exclusion des rafts, ce qui entrave leurs interactions et leur capacité à s'associer en un complexe actif capable de transduire le signal du CNTF. Ces données corroborent parfaitement notre hypothèse selon laquelle l'architecture des membranes, et plus particulièrement celle des rafts, est perturbée lors du vieillissement, ce qui entraîne un défaut de formation du complexe récepteur CNTF-R et une détérioration de la réponse au CNTF.

Différentes zones du cerveau subissent des altérations de leur composition lipidique lors du vieillissement, que ce soit chez le rongeur ou chez l'homme, comme cela a été décrit dans la partie Introduction de ce mémoire. Ces perturbations se répercutent sur l'architecture et l'organisation des membranes et particulièrement sur celles des microdomaines membranaires (Ledesma *et al.*, 2012). Nos résultats apportent des arguments robustes en faveur d'un remaniement membranaire associé au vieillissement, avec une modification des propriétés et de la répartition des sous-populations de rafts corticaux chez les souris âgées. La littérature ne décrit aucun changement de l'expression ou de la localisation de la flotilline-1 au cours du vieillissement (Inomata *et al.*, 2006), ce qui est cohérent avec nos résultats qui montrent des niveaux constants de cette protéine dans les rafts quel que soit l'âge des souris. La littérature décrit aussi, qu'au cours du vieillissement, il n'y a pas de modification de la concentration protéique membranaire globale, mais plutôt un remaniement des protéines associées aux rafts (Jiang *et al.*, 2010). Nos résultats corroborent cette hypothèse, car si les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R

ne sont pas modifiés dans les homogénats cérébraux, ils sont significativement diminués dans les rafts. Il est très probable que ces changements reposent sur, ou au moins coïncident avec des modifications de la composition lipidique des différents microdomaines des membranes cérébrales, ce qui pourrait aussi expliquer l'impact des lipides sur de nombreuses fonctions dont, par exemple, le maintien des récepteurs membranaires (Yehuda *et al.*, 2002). Là aussi, nos résultats sont cohérents avec la littérature et soutiennent l'hypothèse qu'une modification de la composition lipidique des membranes au cours du vieillissement puisse entraîner un remaniement des rafts et des protéines associées, dont les sous-unités du complexe CNTF-R, altérant en conséquence leur fonctionnalité et leur importance biologique.

La diminution de la proportion des rafts de haute densité au profit de rafts de plus faible densité dans le cerveau des souris âgées pourrait aussi signifier une perte de la densité protéique au sein de ces rafts, ce que pourrait refléter l'exclusion des sous-unités du CNTF-R hors des rafts. Or, il est parfaitement admis que l'association de protéines à un environnement membranaire rigide a des conséquences directes sur la structure tridimensionnelle de la protéine. Chacun sait que l'induction de changements de conformation de la chaîne polypeptidique peut affecter l'activité biologique de la protéine, comme l'activité catalytique d'une enzyme ou l'affinité d'un récepteur pour son ligand. La colocalisation de protéines différentes dans le même environnement comme un raft peut favoriser les interactions réciproques entre les différents partenaires. Inversement, l'inclusion d'une protéine particulière dans un raft peut empêcher son interaction avec d'autres protéines préférentiellement localisées dans des régions membranaires plus fluides ou dans une sous-population distincte de rafts, inhibant ainsi la formation de complexes de signalisation et l'activation des cascades qui en découle (Sonnino *et al.*, 2013). L'enrichissement de protéines de signalisation dans les rafts suggère que leur association ou l'association de complexes multiprotéiques puisse représenter un véritable mécanisme de régulation des cascades de transduction du signal. Les rafts sont impliqués dans la signalisation induite par des protéines et leurs récepteurs dont les récepteurs à activité tyrosine kinase comme les récepteurs des neurotrophines (Sonnino *et al.*, 2013). En effet, l'association entre le NGF et son récepteur TrkA ou le BDNF et son récepteur TrkB s'opère dans les rafts et le recrutement de ces récepteurs dans les rafts peut être nécessaire à l'activation de voies de signalisation spécifiques (Suzuki *et al.*, 2004 ; Pereira and Chao, 2007 ; Pryor *et al.*, 2012). En outre, la perturbation des rafts réduit les effets stimulants du BDNF sur la libération du glutamate dans les synaptosomes corticaux. L'intégrité des rafts est nécessaire aussi aux effets du BDNF sur la potentialisation à long terme dans les synapses de l'hippocampe. Ces données démontrent les conséquences fonctionnelles du recrutement de TrkB dans les rafts (Assaife-Lopes *et al.*, 2014). D'autre part, les gangliosides ont la capacité biologique bien connue d'interagir avec les récepteurs Trk et d'influencer leurs activités catalytiques. En effet, GM1 interagit dans les rafts avec les récepteurs des neurotrophines pour exercer des effets neurotrophiques sur la survie neuronale, la croissance des neurites, la différenciation neuronale *in vivo* et *in vitro* et des effets neuroprotecteurs contre différents types de lésions neuronales (Ferrari *et al.*, 1995 ; Ichikawa *et al.*, 2009). Les capacités de GM1 à potentialiser ou à remplacer les neurotrophines dans

leurs actions sont en partie liées à son interaction avec leurs récepteurs. En fait, l'apport de GM1 exogène stimule l'activité kinase des différents récepteurs Trk, leur autophosphorylation et leur dimérisation dans plusieurs types de cellules (fibroblastes, cellules granulaires du cervelet), en affectant différemment la libération des neurotrophines (Rabin *et al.*, 2002).

Finalement, s'il était connu que les rafts jouaient un rôle majeur dans la signalisation cellulaire, notre étude a permis d'aller plus loin dans la compréhension du rôle primordial qu'ils peuvent jouer en physiopathologie du vieillissement. En modulant la microarchitecture et l'organisation des membranes cérébrales, le vieillissement peut avoir un impact délétère sur les fonctionnalités des protéines associées. Outre les conséquences physiopathologiques, il est possible aussi d'entrevoir l'impact du vieillissement sur la disparition éventuelle de cibles thérapeutiques pourtant effectives chez l'individu jeune, disparition susceptible de compromettre l'efficacité des stratégies thérapeutiques destinées à traiter les maladies liées au vieillissement.

E. Le régime hyperlipidique, un facteur de risque du vieillissement

1. Démarche expérimentale

Si les altérations neuronales en lien avec le vieillissement sont logiquement avancées comme un facteur favorisant le développement des maladies neurodégénératives, l'implication d'autres facteurs de risque tels que les maladies métaboliques ou dyslipidémies est aujourd'hui largement documentée (Pasinetti and Eberstein, 2008 ; Frisardi *et al.*, 2010). Il semble pertinent d'imaginer que certaines pathologies chroniques puissent, comme le vieillissement, avoir un impact à long terme sur l'architecture et les propriétés des membranes cellulaires et jouer le rôle d'accélérateur du vieillissement cérébral. Afin de vérifier cette hypothèse, deux groupes de 11 souris C57Bl/6J sauvages mâles jeunes (6 mois à la fin du régime) ont été placés sous régime Std ou HL durant 10 semaines. Le régime Std normocalorique (3,10 kcal/g) a servi de témoin de l'expérimentation et était composé de 18% en kcal de lipides sous forme de matières grasses et d'huiles. Le régime HL hypercalorique (5,14 kcal/g) était quant à lui prévu pour bouleverser significativement les apports lipidiques et a été conçu avec un excès de lipides saturés (60% en kcal) sous forme de matières grasses, principalement du lard et des huiles végétales. Pour valider le développement d'un état dyslipidémique en fin de régime, les masses corporelles et les apports alimentaires ont été suivis individuellement au cours des régimes, en parallèle au prélèvement d'échantillons sanguins à partir desquels ont été dosés le cholestérol et les triglycérides plasmatiques, ainsi que les AG érythrocytaires. L'impact de cette situation pathologique a ensuite été mesuré sur les fonctions cérébrales en caractérisant d'une part, les capacités mnésiques des animaux, et d'autre part, la fonctionnalité du récepteur du CNTF.

2. Analyses des paramètres métaboliques

L'apport alimentaire a consisté à évaluer la quantité d'aliment ingérée une fois par semaine. Les souris concernées se sont adaptées facilement au régime HL en ajustant rapidement leur consommation. En effet, il apparaît clairement que les souris sous régime Std normocalorique ont stabilisé leur consommation alimentaire à $3,8 \pm 0,1$ g/j, alors que les souris sous régime HL hypercalorique ont, dès la première semaine, diminué leurs apports à $2,8 \pm 0,1$ g/j (Figure 49A).

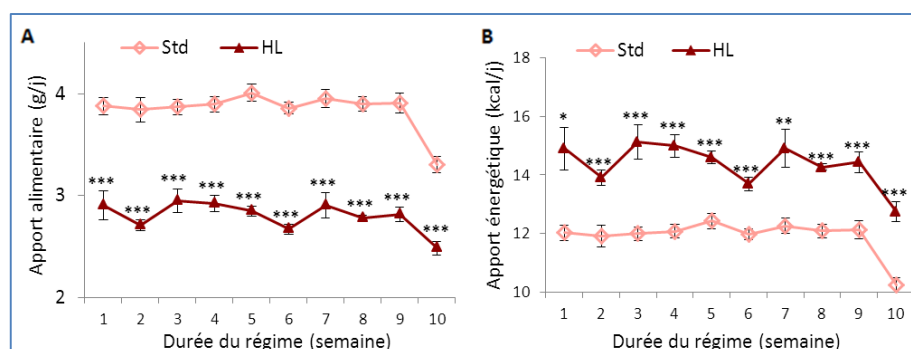


Figure 49: Effets du régime hyperlipidique sur l'apport alimentaire et énergétique des souris de 6 mois

Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe ($N = 11$) calculées chaque semaine du régime de dix semaines. La significativité des différences calculées entre les deux groupes régimes est donnée par * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

Cette différence très significative ($p < 0,0001$) de 30% environ était attendue, puisque plusieurs études préalables nous avaient conduits à l'idée que les souris semblent ajuster spontanément les quantités ingérées en fonction de la densité calorique des aliments. Ce suivi nous a permis de considérer que les souris avaient une consommation stable sur toute la période du régime. Un décrochage de la courbe a bien été observé à la 10^{ème} semaine pour les deux groupes de souris, mais nous avons considéré qu'il était sans doute lié aux prélèvements sanguins réalisés à cette période. Ces analyses ont en effet nécessité des manipulations rapprochées, une mise à jeun de plusieurs heures et deux anesthésies gazeuses, conditions susceptibles de générer un stress pouvant expliquer la perturbation du comportement alimentaire des animaux. Malgré l'ajustement de l'apport alimentaire, les souris sous régime HL bénéficiaient d'un apport calorique moyen de 14,4 kcal/j, soit environ 20% de plus que les souris sous régime Std qui ne recevaient que 11,8 kcal/j (Figure 49B), une différence très significative ($p < 0,0001$) qui a certainement son importance pour expliquer les résultats spécifiques suivants.

La masse corporelle de chacune des souris de l'étude a été mesurée chaque semaine, ce qui nous a permis de constater une évolution distincte entre les deux groupes régimes. Les profils d'évolution de la masse corporelle durant le programme nutritionnel montrent qu'en début de régime, les souris des deux groupes présentent une masse corporelle moyenne comparable, de $24,1 \pm 0,2$ g, et qu'elles ont toutes subi une prise de poids, probablement due à l'hébergement en cage individuelle des animaux et l'accès *ad libitum* à l'aliment (Figure 50A). En outre, ces profils mettent en évidence une augmentation de la masse corporelle des souris, significativement plus marquée ($p = 0,0319$) dans le groupe sous régime HL dès la

5^{ème} semaine (Figure 50A). La prise de poids finale, calculée en comparant la masse corporelle de chaque souris au début et à la fin du régime, est de $+4,0 \pm 0,2$ g sous régime Std, soit un gain d'environ 16% de leur masse initiale ($24,1 \pm 0,3$ g), tandis que celle des souris sous régime HL est de $+8,4 \pm 0,7$ g, soit plus de 34% de leur masse initiale ($24,0 \pm 0,3$ g). Au terme du programme nutritionnel, les souris sous régime HL présentaient donc un surpoids significatif ($p < 0,0001$) par rapport aux souris sous régime Std (Figure 50B). Une comparaison détaillée semaine par semaine des profils de variation de la masse corporelle des souris des deux groupes nous a permis de constater que la différence de prise de poids entre les deux groupes débute à partir de la 4^{ème} semaine ($p = 0,0052$). Pendant cette période, les souris sous régime Std gagnent en moyenne 0,3 g par semaine, alors que celles sous régime HL gagnent en moyenne 0,9 g.

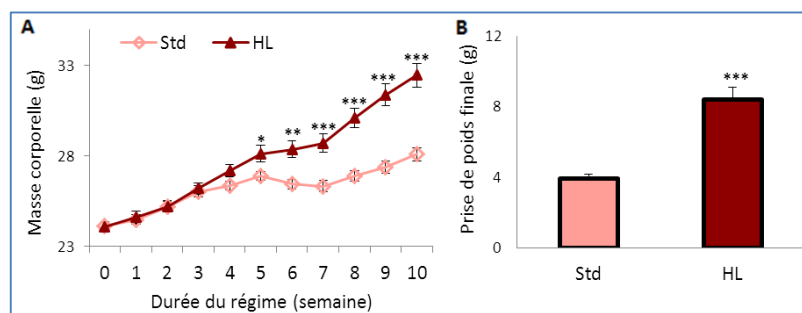


Figure 50 : Effets du régime hyperlipidique sur l'évolution de la masse corporelle des souris de 6 mois

Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe ($N = 11$), calculées (A) chaque semaine du programme (B) en comparant la masse corporelle de chaque souris au début et à la fin du régime. La significativité des différences calculées entre les deux groupes régimes est donnée par * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

Afin de visualiser d'éventuels effets des régimes administrés sur le métabolisme lipidique, les taux de cholestérol et de TG plasmatiques, ainsi que la teneur érythrocytaire en AG, ont été mesurés avant le changement de régime et en fin de programme nutritionnel. Pour limiter la confusion générée par la variabilité interindividuelle et nous focaliser sur les effets induits par le régime seul, nous avons choisi de représenter les résultats de ces marqueurs par la différence des concentrations mesurées entre le début et la fin du programme nutritionnel, chaque souris étant ainsi son propre témoin des effets du régime administré. Les concentrations de cholestérol plasmatique mesurées ont montré des différences significatives ($p = 0,0015$) entre les deux groupes régimes (Figure 51A). Cette élévation des taux plasmatiques de cholestérol était, au terme des 10 semaines du programme, près de 4 fois plus élevée chez les souris placées sous régime HL ($+0,30$ mg/mL) que chez celles sous régime Std ($+0,08$ mg/mL). Ce résultat peut probablement s'expliquer par l'apport exogène important de cholestérol dans les ingrédients du régime HL, en particulier les composés présents dans le lard. Il aurait pu être intéressant de préciser les investigations en évaluant la répartition du cholestérol associé aux HDL ou aux LDL afin d'établir un profil lipoprotéique. Un apport important de lipides d'origine animale comme le lard tend normalement à augmenter les LDL, considérés comme néfastes en regard du risque cardiovasculaire, et à diminuer les HDL, considérées elles comme bénéfiques (Kushwaha *et al.*, 1978 ; Tsuda *et al.*, 1983). L'autre paramètre biologique important lié au métabolisme lipidique est la triglycéridémie. Les concentrations en TG mesurées

dans le plasma ont montré que les souris sous régime Std présentait une réduction modérée et non significative de leur triglycéridémie au cours du temps ($-0,08$ mg/mL, $p = 0,0528$), alors qu'aucune différence n'a été décelée suite au régime HL (Figure 51B). Il faut d'ailleurs rappeler que la souris est une espèce qui accumule moins les TG plasmatiques que l'homme, ce qui pourrait expliquer l'influence très limitée du régime HL sur ce paramètre. Les variations de la cholestérolémie et les tendances décrites pour la triglycéridémie ont été observées dès la 5^{ème} semaine du programme nutritionnel, et se sont légèrement accentuées ensuite pour le cholestérol.

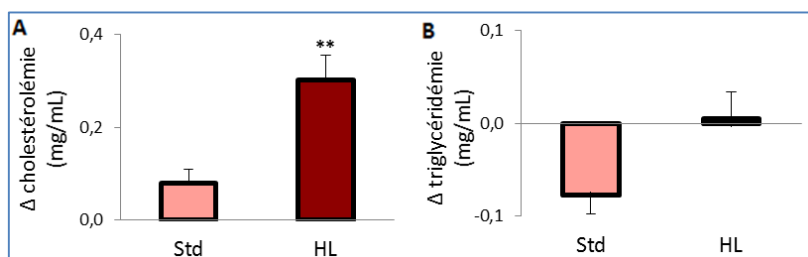


Figure 51 : Effets du régime hyperlipidique sur l'évolution de la cholestérolémie et de la triglycéridémie des souris de 6 mois

Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe ($N = 11$). La significativité des différences calculées entre les deux groupes régimes est donnée par ** $p < 0,01$.

Des études antérieures du laboratoire ayant corrélé le profil des AG érythrocytaires à celui des AG cérébraux, nous avons privilégié l'examen des AG érythrocytaires afin de limiter le nombre d'animaux utilisés par groupe et nous permettre de réserver les structures cérébrales pour d'autres analyses. Pris séparément, seule la variation de concentration de l'acide stéarique (C18:0) diffère statistiquement ($p = 0,0049$) entre les deux groupes régimes. Son niveau de variation passe de $-0,018 \pm 0,011$ mg/mL pour les souris sous régime standard à $+0,055 \pm 0,020$ mg/mL pour celles sous régime hyperlipidique (Figure 52A). Ce résultat peut probablement s'expliquer par l'apport exogène d'AGS dans les ingrédients du régime hyperlipidique, en particulier ceux apportés par le lard. Aucune différence significative n'a été décelée dans la teneur relative des autres AG dont l'acide palmitique (C16:0), oléique (C18:1n-9), LA (C18:2n-6) (Figure 52A), ARA (C20:4n-6), docosatétranoïque (C22:4n-6), DHA (C22:6n-3) (Figure 52B), palmitoléique (C16:1n-7), ALA (C18:3n-3) et EPA (C20:5n-3), ni dans le ratio des AGPI n-6/n-3 (Figure 52C).

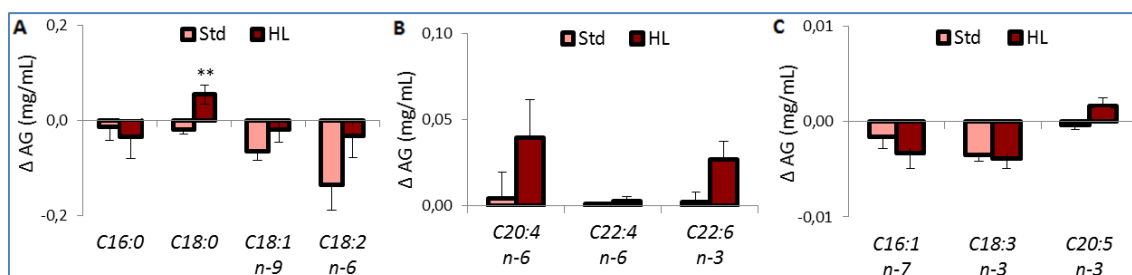


Figure 52: Effets du régime hyperlipidique sur l'évolution des AG érythrocytaires des souris de 6 mois

Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe ($N = 11$). La significativité des différences calculées entre les deux groupes régimes est donnée par ** $p < 0,01$.

En conclusion, le suivi de ces divers paramètres nous a permis de valider que les conditions de régimes choisis ont induit un état dyslipidémique chez les souris adultes jeunes. Ce modèle nous permettra d'examiner l'impact d'un tel état sur la structure et la fonctionnalité des rafts corticaux ainsi que les conséquences sur les capacités mnésiques et l'activité du récepteur du CNTF.

3. Impact du régime hyperlipidique sur la structure des microdomaines membranaires

Nous avons étudié l'impact du régime HL sur le remodelage des microdomaines des membranes du cortex cérébral des souris de l'âge de 6 mois en adoptant la même stratégie expérimentale de fractionnement membranaire suite à l'action du Triton X-100 et après ultracentrifugation en gradient continu de saccharose dans les mêmes conditions que précédemment (Figure 53).

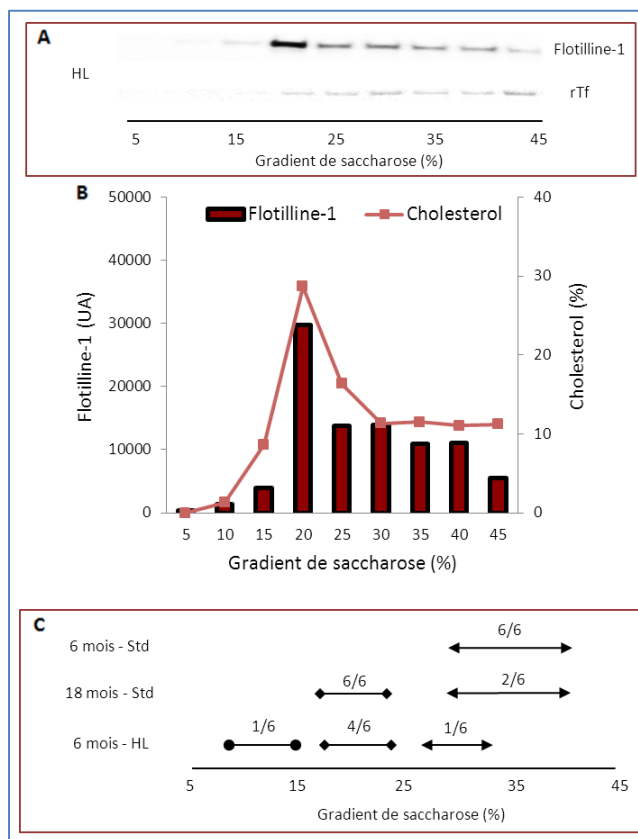


Figure 53: Effets du régime hyperlipidique sur la répartition des microdomaines membranaires de cortex des souris de 6 mois

Le profil présenté correspond à un échantillon des extraits membranaires corticaux représentatif du groupe de souris de 6 mois sous régime hyperlipidique (N = 6). Le niveau de cholestérol dans chaque fraction a été rapporté à la quantité totale de toutes les fractions confondues et est exprimé en pourcentage.

Dans le groupe de souris sous régime HL, une seule fraction riche en flotilline-1 et en cholestérol se démarque, correspondant à une sous-population de rafts de faible densité présente au niveau de la

concentration de 20% de saccharose (Figures 53A et 53B). La figure 53C représente l'ensemble de la répartition des rafts en fonction du gradient de saccharose et montre que 5 souris sur 6 de ce groupe présentent majoritairement des sous-populations de rafts de faible densité, dans les fractions entre 10 et 20% de saccharose, tandis qu'une seule souris montre une sous-population de rafts de haute densité dans la fraction à 30% de saccharose. Les différentes fractions identifiées correspondent donc majoritairement à des microdomaines de faible densité, distincts de ceux observés précédemment chez les souris du même âge, 6 mois, sous régime Std. Ces résultats suggèrent donc que le régime HL puisse modifier les propriétés biophysiques des membranes en induisant des mécanismes de remodelage conduisant à privilégier les rafts de faible densité au détriment de ceux de plus forte densité (Figure 53A). Nous avons aussi pu constater que les modifications membranaires accompagnant la dyslipidémie développée sous régime HL conduisaient à des profils de rafts corticaux de plus faible densité et donc comparables à ceux observés précédemment chez les souris de 18 mois sous régime Std. Ceci suggère que l'état dyslipidémique induit chez les souris adultes jeunes puisse exercer un effet pro-vieillesse sur les membranes neuronales dont la fonctionnalité des protéines associées pourrait être menacée, tout comme la formation de signalosomes récepteurs.

Dans la littérature, peu de données concernent les effets d'une dyslipidémie sur l'organisation ou la composition des rafts dans le cerveau. Cependant, une étude récente a montré que l'obésité induite par un régime hyperlipidique dans un modèle de souris *ob/ob*, réduit de 30% l'accumulation du complexe récepteur de l'insuline dans les rafts d'hippocampe de souris âgées de 4 mois (Delint-Ramirez *et al.*, 2014). La signalisation par AKT associée à ce récepteur est elle aussi diminuée de 70%. Ces résultats suggèrent un rôle fonctionnel des protéines localisées dans les rafts pour une signalisation insulinique optimale dans le cerveau. Les changements de profil lipidique au cours de l'obésité pourraient ainsi modifier l'association et la distribution des protéines dans les microdomaines membranaires, ce qui aurait pour conséquence d'en altérer la signalisation. Vu le bouleversement observé dans la distribution des rafts de nos souris sous régime HL, il est tout à fait logique de supposer que d'autres complexes récepteurs subissent des perturbations d'association et de signalisation. C'est ce que nous avons voulu vérifier pour le CNTF-R.

4. Impact du remodelage membranaire lié au régime hyperlipidique sur le complexe récepteur CNTF-R et son activité

Devant les similitudes structurales apparentes déduites des profils obtenus à partir des membranes corticales chez l'animal âgé et chez l'animal dyslipidémique, nous avons voulu comparer les conséquences des changements constatés sur le complexe récepteur CNTF-R (Figure 54). Comme nous l'avons déjà observé pour l'âge, nous avons au préalable vérifié que le régime HL n'a pas modifié significativement le niveau protéique global de LIFR β ($p = 0,7445$), de CNTFR α ($p = 0,9025$) et de la flotilline-1 ($p = 0,1193$) dans les fractions membranaires.

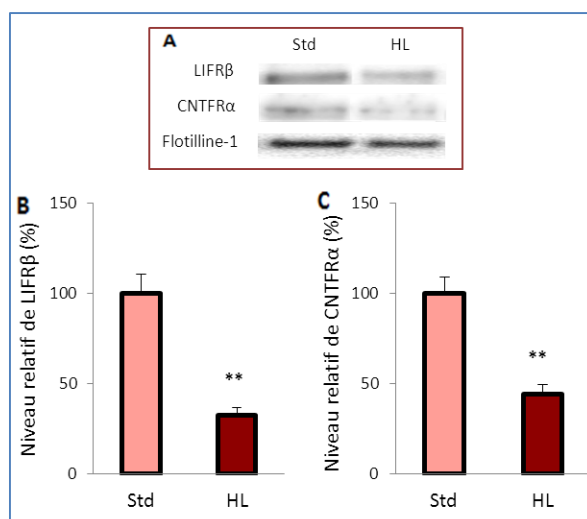


Figure 54 : Effets du régime hyperlipidique sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans les rafts corticaux des souris de 6 mois

*Le niveau relatif des protéines LIFRβ et CNTFRα évalué par analyse densitométrique des immunoblots a été normalisé par rapport à la flotilline-1 et comparé au niveau protéique relatif calculé au sein du groupe de souris âgées de 6 mois sous régime standard utilisé comme référence et considéré égal à 100%. Les valeurs représentées sont les moyennes ± SEM par groupe (N = 6). La significativité des différences calculées entre les deux groupes âgés est donnée par **p<0,01.*

Les niveaux protéiques des sous-unités LIFRβ et CNTFRα dans les rafts corticaux des souris de 6 mois sous régime HL ont été étudiés par immunoblot dans les fractions riches en flotilline-1 et en cholestérol (Figure 54A). Les mesures réalisées ont été normalisées par rapport au niveau de flotilline-1 et comparées à celles des mêmes protéines dans les rafts des souris de 6 mois sous régime Std utilisées comme contrôles et ajustées à 100%. Comme nous l'avons constaté précédemment en association au vieillissement chez les souris de 18 mois, les taux de LIFRβ (Figure 54B) et de CNTFRα (Figure 54C) sont apparus réduits de manière significative dans les fractions rafts des souris de 6 mois sous régime HL par rapport à celles de 6 mois sous régime Std, avec une baisse respective de 68% ($p = 0,0012$) et de 56% ($p = 0,0018$). Une nouvelle fois, cette approche n'a pas permis de détecter gp130, sans doute en raison d'un niveau trop faible dans nos échantillons de rafts. Mais nos résultats peuvent néanmoins suggérer que le régime HL a contribué à remanier l'organisation et la composition des microdomaines membranaires du cortex cérébral au point d'en exclure les sous-unités du complexe récepteur CNTF-R. Sur ce point aussi, la dyslipidémie exerce une influence pro-vieillesse susceptible d'altérer les fonctionnalités des membranes cérébrales.

Nous avons montré que le régime HL ne modifiait pas les niveaux de LIFRβ et CNTFRα, ainsi que ceux de la flotilline-1 dans la fraction membranaire. Pour compléter ces résultats, une analyse par immunoblot a été réalisée sur des homogénats totaux de cortex ou d'hippocampe des souris. Les souris sous régime HL montraient des niveaux protéiques à peine et non significativement plus faibles que ceux des souris témoins sous régime Std ajustés à 100% (ligne pointillée), de $87,4 \pm 18,2\%$ ($p = 0,4245$) pour gp130, et de $88,8 \pm 19,7\%$ ($p = 0,1380$) pour CNTFRα, (Figure 55). Ceci suggère que le régime HL ne semble modifier ni les niveaux d'expression, ni l'adressage de ces protéines à la membrane. Par contre, une diminution modérée mais significative a été observée pour LIFRβ dont le niveau protéique est passé à

78,1 ± 15,8% ($p = 0,0143$) dans les souris sous régime HL, ce qui peut paraître étonnant au vu des données de la littérature ne décrivant pas de changement de l'expression des sous-unités du récepteur du CNTF ou spécifiquement du CNTFR α dans le cadre d'une pathologie (Conejero-Goldberg *et al.*, 2011).

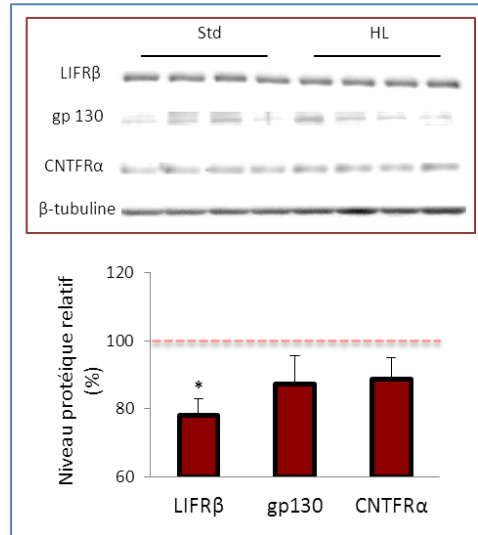


Figure 55 : Effets du régime hyperlipidique sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans les homénats totaux d'hippocampe des souris de 6 mois

Le niveau relatif des protéines LIFR β , gp130 et CNTFR α évalué par analyse densitométrique des immunoblots a été normalisé par rapport à la β -tubuline, et comparé au niveau protéique relatif calculé au sein du groupe de souris âgées de 6 mois sous régime standard utilisé comme référence et représenté par la ligne pointillée à 100%. Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe (N = 10). La significativité des différences calculées entre les deux groupes âgés est donnée par * $p < 0,05$.

L'obésité et le syndrome métabolique sont liés à une inflammation systémique. En effet, les dysfonctionnements métaboliques, induits par un régime HL, ont été corrélés positivement avec des marqueurs de la phase aiguë de l'inflammation comme la protéine C réactive ou le fibrinogène, des altérations de l'expression des gènes de biosynthèse des mitochondries, un accroissement du stress oxydant, changements favorisant le développement de pathologies cérébrales (Uranga *et al.*, 2010). Plusieurs neurotrophines actives sur les cellules inflammatoires sont aujourd'hui considérées comme des médiateurs de l'inflammation, dont les taux plasmatiques peuvent jouer un rôle important dans les effets associés à ces troubles métaboliques. Chez les femmes adultes, il a été décrit que les concentrations plasmatiques de NGF sont 1,4 fois plus élevées chez les sujets en surpoids ou obèses. Le taux plasmatique de NGF a ainsi été corrélé positivement à l'IMC, à l'adiposité corporelle et au tour de taille chez les sujets présentant une obésité non morbide. En revanche, la NT-3 et le BDNF semblent être davantage liés au profil lipidique qu'à l'IMC. Le NGF est quant à lui régulé à la hausse en cas d'obésité, de diabète de type 2 ou de syndrome métabolique (Bulló *et al.*, 2007). Une autre étude récente a montré que chez des patients présentant un diabète de type 2, les niveaux sériques de NT-3 et de BDNF sont plus élevés, tandis que ceux de NGF sont réduits. Ces taux ont respectivement été corrélés respectivement positivement et négativement avec des éléments du syndrome métabolique comme la pression artérielle et les métabolismes glucidique ou lipidique (Civelek *et al.*, 2013). Nous pourrions alors supposer que chez les

patients dyslipidémiques, l'augmentation des taux de neurotrophines est une réaction compensatoire de l'insensibilité du système à ces facteurs qui pourrait être liée au défaut de signalisation résultant de la perte fonctionnelle de leurs récepteurs. Une situation qui s'apparenterait à une résistance aux neurotrophines sur le même schéma qu'une résistance à l'insuline ou à la leptine lors d'un diabète ou d'une obésité.

Dans le cerveau de souris placées sous régime HL et comparativement à des souris sous régime Std, les taux de neurotrophines subissent, comme au niveau périphérique, des modifications notamment pour le BDNF, NT-3 et le récepteur TrkB (Yamada-Goto *et al.*, 2012). L'intérêt et la nouveauté de notre étude par rapport à la littérature a été de montrer que comme la souris âgée, la souris dyslipidémique sous régime HL subit un remodelage des membranes neuronales qui semble exclure les sous-unités LIFR β et CNTFR α des rafts du cortex cérébral. Il nous fallait alors déterminer les conséquences fonctionnelles que la dyslipidémie développée chez la souris jeune sous régime HL aurait pu induire sur le complexe récepteur CNTF-R. Nous avons pour cela adopté la même démarche que celle suivie pour étudier les effets du vieillissement, distinguant dans chaque groupe régime deux sous-groupes de 5 souris dans le cerveau desquelles a été injecté le CNTF ou la solution véhicule.

La signalisation du CNTF a été étudiée 3 h après l'injection, en suivant l'activation des voies de STAT₃ et ERK_{1/2}. Les effets du régime ont été évalués en comparant les niveaux de phosphorylation des protéines STAT₃ ou ERK_{1/2} à ceux mesurés chez les souris de 6 mois sous régime Std utilisés comme contrôles et ajustés à 100% (Figure 56).

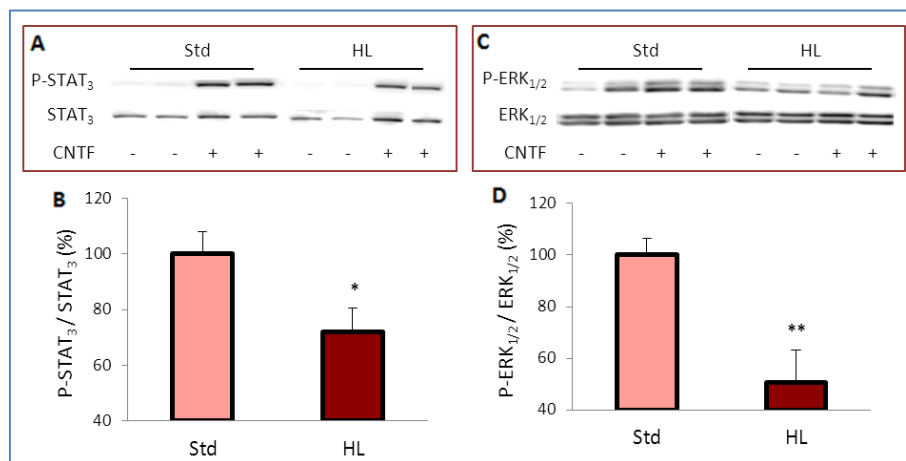


Figure 56 : Effets du régime hyperlipidique sur l'activation par le CNTF des voies de transduction de STAT₃ et ERK_{1/2} dans l'hippocampe des souris de 6 mois

Les proportions des formes phosphorylées P-STAT₃ et P-ERK_{1/2} ont été normalisées par rapport aux teneurs totales de protéines STAT₃ et ERK_{1/2} phosphorylées et non, évaluées par analyse densitométrique des immunoblots. L'activation des voies a été mesurée en prenant en compte la différence de ces proportions entre les souris ayant subi l'injection de solution véhicule et celles ayant subi l'injection de CNTF. Les figures B et D ont été réalisées en exprimant les taux relatifs de P-STAT₃ et P-ERK_{1/2} chez les souris sous régime hyperlipidique comparativement à ceux des souris sous régime standard considérés comme références et ajustés à 100%. Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe (N = 5). La significativité des différences calculées entre les deux groupes régimes est donnée par * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Une différence d'activation de près de 30% ($p = 0,0402$) a été observée pour la voie principale de transduction par STAT₃ dans l'hippocampe du groupe de souris sous régime HL (Figures 56A et 56B). En parallèle l'activation de la voie de ERK_{1/2} est aussi diminuée de près de 50% ($p = 0,0056$, Figures 56C et 56D).

La transduction du signal consécutif à l'injection de CNTF est donc apparue significativement altérée chez les souris dyslipidémiques.

Enfin, une évaluation comportementale a été réalisée avant et à l'issue du programme nutritionnel afin d'évaluer les effets du régime HL sur chaque animal. Ce suivi mené à l'aide du dispositif du labyrinthe en Y a permis de vérifier que la sociabilité, la mobilité et les capacités exploratoires étaient inchangés entre les différents groupes. Ainsi, le nombre de bras du Y explorés par les souris n'était pas statistiquement différent entre le début et la fin du régime hyperlipidique ($p = 0,1454$), ni entre les deux groupes régimes en fin de programme nutritionnel ($p = 0,5423$). Cette étude a aussi permis d'évaluer la sensibilité des capacités mnésiques des souris soumises aux deux régimes. Aucune altération significative de la mémoire à court terme n'a été mise en évidence, ni entre le début et la fin du régime HL ($p = 0,0612$), ni entre les deux groupes régimes en fin de programme nutritionnel ($p = 0,8459$).

Nous avons montré que, chez la souris jeune rendue dyslipidémique par un régime alimentaire HL, le remaniement protéique mis en évidence au sein des rafts est associé, au même titre que le vieillissement, à une altération de la fonctionnalité du récepteur du CNTF. Ces résultats sont particulièrement intéressants, car ils démontrent que ces deux facteurs de risques majeurs produisent des conséquences délétères comparables sur l'organisation des membranes neuronales et la fonctionnalité d'une cible protéique associée. Un lien étroit a été décrit entre le vieillissement cérébral physiologique et les altérations du métabolisme et de la biodisponibilité des lipides (Gao *et al.*, 2013). Il est associé notamment à des variations qualitatives et quantitatives de la composition lipidique des membranes neuronales (Ledesma *et al.*, 2012). Des corrélations entre les déséquilibres alimentaires, la dyslipidémie, les troubles métaboliques et les altérations cognitives ont par ailleurs été démontrées dans diverses études (Pasinetti and Eberstein, 2008 ; Frisardi *et al.*, 2010), ce qui suggère que ces troubles puissent accélérer le vieillissement cérébral ou exacerber les dysfonctionnements du cerveau âgé. La composition quantitative et qualitative en lipides des membranes neuronales est en effet un paramètre déterminant de divers mécanismes essentiels comme les processus de fusion membranaire, la fonctionnalité des récepteurs membranaires et l'activation des voies de signalisation impliquées dans l'équilibre entre la survie et la mort apoptotique des cellules (Ledesma *et al.*, 2012). Tous ces mécanismes ont été rapportés comme modifiés dans la MA, et l'hypothèse de l'implication d'un remodelage de la membrane des neurones et de changements dans la micro-localisation des protéines a été proposée, comme il l'a été observé dans les rafts corticaux de souris transgéniques 3xTgAD modèles de MA, mimant l'accumulation de protéines Tau et de peptide A β dans le cerveau (Chadwick *et al.*, 2010) ou chez l'homme (Martín *et al.*, 2010 ; Fabelo *et al.*, 2014). En outre, un nombre croissant de preuves indique que des changements dans l'homéostasie des lipides et particulièrement du cholestérol peuvent influencer la susceptibilité à la MA (Pinçon *et al.*, 2015) et sa progression (Reitz, 2013). Il a notamment été montré que les dyslipidémies peuvent affecter la composition lipidique des membranes cellulaires en augmentant le taux de cholestérol membranaire et le rapport cholestérol/phospholipides,

avec comme conséquence directe la perturbation de la stœchiométrie des complexes des rafts (Chadwick *et al.*, 2010 ; Reitz, 2013). Par conséquent, les changements de composition lipidique des rafts, tels que ceux causés par l'exposition au cours de la vie à une dyslipidémie ou à un déséquilibre alimentaire en lipides, même à un jeune âge, peuvent perturber significativement les membranes et compromettre plusieurs activités cellulaires essentielles dont la transduction des signaux cellulaires.

F. Conclusions

Analysés dans leur globalité, les résultats de notre étude et les interprétations que nous en avons proposées nous conduisent à considérer la composition de la membrane plasmique et l'organisation de ses microdomaines comme des paramètres déterminants des fonctions neuronales, de la plasticité et de la survie cellulaire. L'importance de ces paramètres lors du vieillissement ou dans la susceptibilité aux maladies neurodégénératives, en particulier la MA, doit être reconnue. Un apport alimentaire excessif en lipides peut affecter l'un et l'autre de ces deux paramètres, ce qui peut conduire en conséquence à une réactivité altérée de cibles moléculaires tels que le complexe du CNTF-R et les autres récepteurs associés à la membrane. Nos résultats permettent d'apporter des éléments nouveaux et pertinents sur les mécanismes communs et la manière dont les facteurs de risque sensibilisent le SNC aux maladies telle que la MA, le rendant à la fois plus vulnérable et moins réactif, notamment en réponse aux signaux endogènes ou aux stratégies thérapeutiques ciblées.

II. Le DHA, facteur anti-vieillessement, prévient des dyslipidémies, restaure les capacités de réponse cérébrale au CNTF et protège du déclin cognitif

La première partie de ce travail nous a permis de valider l'hypothèse selon laquelle l'intégrité de la microarchitecture membranaire est un élément clé de la fonctionnalité des neurones et que les dyslipidémies chroniques ou l'âge sont capables d'altérer les propriétés des bicouches lipidiques. Ces anomalies se répercutent par une perte de fonction des protéines qui y sont insérées qui pourrait expliquer certains déficits cognitifs. Il est très probable aussi que ces conditions puissent affecter la réactivité de cibles moléculaires au point d'altérer l'efficacité de stratégies thérapeutiques pourtant jugées prometteuses au regard des effets constatés sur des modèles précliniques de MA. Nos résultats imposent donc l'idée que la membrane neuronale puisse représenter une cible d'intérêt dont les propriétés et les fonctionnalités doivent être préservées. Dans cet objectif précis, nous avons voulu évaluer l'efficacité d'interventions nutritionnelles reposant sur des apports lipidiques optimisés. Plusieurs études dont certaines menées au laboratoire ont décrit les effets neuroprotecteurs des AGPI *n*-3 à longue chaîne *in vitro* comme *in vivo* (Florent-Bécharde *et al.*, 2007 ; Lavialle and Layé, 2010 ; Oster and Pillot, 2010 ; Slee *et al.*, 2010 ; Solfrizzi *et al.*, 2010 ; Bazan *et al.*, 2011 ; Denis *et al.*, 2013), mais les mécanismes impliqués – certainement complexes et multiples – ne sont pas clairement élucidés. Lors de travaux préalables (Florent-Bécharde *et al.*, 2007), nous avons montré que la neuroprotection exercée par le DHA, en particulier contre le stress amyloïde, est associée à l'incorporation de l'AGPI dans la membrane. Ceci suggère l'hypothèse que parmi les mécanismes mis en jeu, l'accrétion membranaire du DHA puisse impacter sur l'organisation et les propriétés de la bicouche. Dans cette seconde partie, nous avons donc étudié si une supplémentation alimentaire adaptée en DHA pouvait avoir la capacité de prévenir ou remédier aux perturbations de la membrane neuronale afin de préserver ou restaurer la fonctionnalité du récepteur du CNTF chez les souris âgées.

A. Le DHA, un facteur de protection contre la dyslipidémie et le vieillissement biologique

1. Démarche expérimentale

Afin de vérifier notre hypothèse selon laquelle le DHA exerce un effet neuroprotecteur en remodelant la membrane neuronale, deux groupes de 40 souris C57Bl/6J sauvages mâles âgées (18 mois à la fin du régime) ont été placés sous régime Std ou sous régime DHA+ enrichi en DHA durant 10 semaines. Le régime Std est identique à celui décrit précédemment et a servi de témoin à l'expérimentation, tandis que le régime DHA+ correspondait au régime Std supplémenté par 0,3% (m/m) de DHA sous forme d'ester éthylique (DHA-EE). L'augmentation calorique liée à cette supplémentation a été considérée comme négligeable. Ce programme nutritionnel a déjà été utilisé au laboratoire et permis de constater

l'enrichissement effectif en cet AGPI dans les structures cérébrales. Les profils des AG érythrocytaires et cérébraux avaient en effet mis en évidence une augmentation très significative des teneurs érythrocytaires, hippocampiques et corticales en DHA, associée à une nette réduction des ratios AGPI *n-6/n-3* et ARA/DHA dans ces mêmes échantillons chez les souris supplémentées en DHA par rapport à celles sous régime standard considérées lors de l'expérimentation comme le groupe témoin âgé.

2. Analyses des paramètres métaboliques

Différents paramètres liés à l'impact métabolique des régimes ont été suivis individuellement pour chaque souris : masse corporelle et apport alimentaire, cholestérol et triglycérides plasmatiques AG érythrocytaires. L'apport alimentaire a été estimé deux fois par semaine, ce qui nous a permis d'observer que les souris des deux groupes avaient une consommation stable sur toute la durée du programme nutritionnel. Les souris du groupe concerné se sont facilement adaptées au régime DHA+ riche en DHA. Leur consommation, stabilisée à $5,7 \pm 0,1$ g/j, était même supérieure dès la première semaine à celle des souris témoins sous régime Std évaluée à $3,8 \pm 0,1$ g/j (Figure 57).

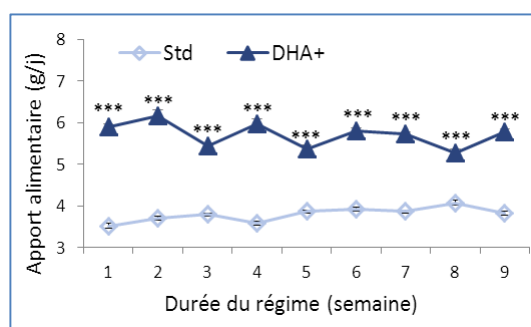


Figure 57 : Effets du régime supplémenté en DHA sur l'apport alimentaire des souris de 18 mois

Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe (N = 40). La significativité des différences calculées entre les deux groupes régimes est donnée par *** $p < 0,001$.

Cette augmentation très significative ($p < 0,0001$) de 50% était plutôt inattendue et deux hypothèses pourraient selon nous expliquer cet écart. La première hypothèse est liée à la texture des croquettes riches en DHA. En effet, celles-ci ont été produites à partir des croquettes du régime Std réduites en une poudre à laquelle le DHA-EE a été ajouté, puis reconstituées au même format. Cette procédure d'enrichissement a certainement rendu les croquettes DHA+ plus friables, ce qui a pu conduire à surestimer quelque peu l'apport alimentaire mesuré, puisque seules les croquettes restées dans la mangeoire et leurs plus gros fragments ont été pesés, n'ayant pu tenir compte des pertes éventuelles sous forme de poudre ou de petits débris au fond de la cage. Il est peu probable néanmoins que l'erreur commise alors puisse expliquer à elle seule la différence importante d'apport alimentaire entre les deux groupes. Une seconde hypothèse, plus vraisemblable car déjà observée dans plusieurs études similaires préalables, semble suggérer que le DHA ait pu améliorer sensiblement les propriétés organoleptiques de l'aliment enrichi dont

la texture, le goût ou l'odeur ont pu faciliter sa consommation ou la rendre plus agréable ou attirante pour les souris.

Le suivi hebdomadaire de la masse corporelle de chaque souris a permis de constater une évolution distincte des deux groupes sous l'influence de leur régime respectif. Les profils montrent une stabilité remarquable de la masse corporelle des souris témoins sous régime Std, autour de $32,3 \pm 0,1$ g, tout au long des 10 semaines du programme (Figure 58A). Ils montrent aussi que les souris supplémentées en DHA se distinguent des témoins dès la 1^{ère} semaine par une prise de poids significative qui tend à se stabiliser dans la 2^{ème} moitié du programme. Au terme des 10 semaines, les souris témoins accusent une prise de poids faible et non significative de $+0,6 \pm 0,2$ g ($p = 0,8915$), soit environ 3% de leur masse corporelle initiale ($31,9 \pm 0,4$ g), mesurée sur les souris des deux groupes au début du programme. En revanche, les souris sous régime DHA+ prennent significativement plus de poids, $+3,6 \pm 0,4$ g ($p < 0,0001$), soit une augmentation de près de 11% (Figure 58B). Nous postulons que le surpoids induit soit lié à un apport alimentaire plus élevé plutôt qu'à un éventuel impact métabolique du DHA, plutôt connu comme anti-obésogène malgré les controverses de la littérature (Barre, 2007).

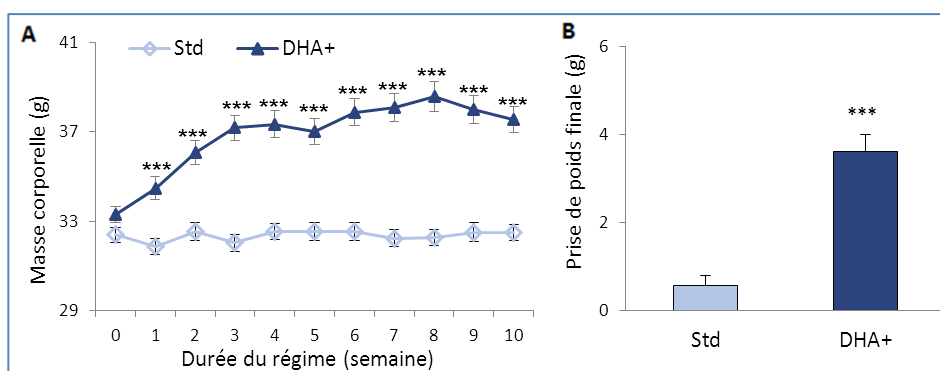


Figure 58 : Effets du régime supplémenté en DHA sur l'évolution de la masse corporelle des souris de 18 mois

Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe ($N = 40$) des mesures (A) hebdomadaires tout au long du programme ou (B) à la fin du programme. La significativité des différences calculées entre les deux groupes régimes est donnée par *** $p < 0,001$.

Afin de visualiser d'éventuels effets sur le métabolisme lipidique liés aux régimes administrés, le cholestérol et les TG plasmatiques ont été mesurés avant le changement de régime et au cours de la 10^{ème} semaine du programme nutritionnel. Afin de limiter la confusion liée aux grandes variabilités interindividuelles et ainsi clarifier les effets propres du régime lui-même, nous avons comme précédemment choisi de représenter nos résultats par les différences comparant les concentrations mesurées entre le début et la fin du programme nutritionnel, chaque souris étant ainsi son propre témoin des effets du régime administré. Les taux de cholestérol plasmatique ont montré des variations très significatives ($p < 0,0001$) entre les deux groupes régimes, avec une augmentation de $+0,19 \pm 0,03$ mg/mL chez les souris témoins, mais une baisse de $-0,11 \pm 0,02$ mg/mL chez les souris sous régime DHA+

(Figure 59A). Entre le début et la fin du programme nutritionnel, les variations mesurées étaient significative, tant l'augmentation de la cholestérolémie chez les souris sous régime Std ($p < 0,0001$) que la diminution de la cholestérolémie chez les souris sous régime DHA+ ($p = 0,0025$). L'opposition des tendances de l'évolution du taux de cholestérol selon le régime était visible dès la 5^{ème} semaine du programme nutritionnel et s'est légèrement accentuée ensuite. Ces résultats illustrent et confirment certainement les propriétés hypocholestérolémiantes bien connues du DHA et des AGPI *n-3* (Holub, 2009 ; Golubet *al.*, 2011 ; Tang *et al.*, 2012 ; ANSES, 2013). Le cholestérol étant aussi avancé comme l'un des facteurs de risque du développement de la MA, les capacités hypocholestérolémiantes du DHA pourraient offrir un avantage primordial pour prévenir cette pathologie.

Les taux de TG plasmatiques ont montré des évolutions similaires et des différences tout aussi significatives ($p < 0,0001$) entre les deux groupes régimes, avec une triglycéridémie augmentée de $+0,14 \pm 0,03$ mg/mL dans les souris témoins, mais diminuée de $-0,04 \pm 0,02$ mg/mL dans les souris sous régime DHA+ (Figure 59B). Les variations calculées entre le début et la fin du programme nutritionnel étaient toutes significatives, l'augmentation de la triglycéridémie chez les souris sous régime Std ($p = 0,0008$) comme la diminution de la triglycéridémie chez les souris sous régime DHA+ ($p = 0,0483$). Nos résultats sont parfaitement en accord avec ceux décrits dans d'autres études animales et humaines (Robbez Masson *et al.*, 2008 ; Yurko-Mauro *et al.*, 2010 ; Guichardant *et al.*, 2015) et suggèrent que le DHA puisse exercer un effet bénéfique sur ce paramètre clé du risque cardiovasculaire.

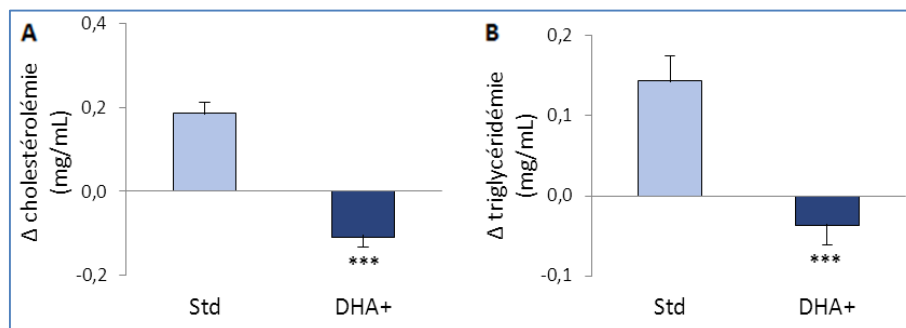


Figure 59 : Effets du régime supplémenté en DHA sur les lipides plasmatiques des souris de 18 mois

Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe (N = 40). La significativité des différences calculées entre les deux groupes régime est donnée par *** $p < 0,001$.

Nous avons regroupé sur une même figure les résultats concernant le cholestérol (Figure 60A) et les TG (Figure 60B) obtenus chez les souris de 6 mois sous régime HL et chez celles de 18 mois sous celui supplémenté en DHA (DHA+), ainsi que les témoins d'âge correspondants sous régime Std. Pour éviter de surcharger la figure, seules ont été représentées les significativités par rapport au groupe témoin de souris de 6 mois sous régime Std. Les souris de 6 mois sous régime HL présentaient donc une augmentation significative ($p = 0,0106$) de leur cholestérolémie et une tendance à la hausse, non significative cette fois ($p = 0,2518$), étaient observée chez les souris de 18 mois sous régime Std, modèle de vieillissement biologique. Une tendance à l'hypertriglycéridémie ($p = 0,6313$) était aussi observée chez les souris de 6 mois

sous régime HL, augmentation par contre très significative ($p = 0,0008$) chez les souris de 18 mois sous régime Std. Ces données avaient alors permis de conclure que le vieillissement et un apport alimentaire déséquilibré en lipides chez la souris pouvaient tous deux modifier le métabolisme lipidique et entraîner une dyslipidémie. Il est intéressant aussi de constater que les souris de 18 mois supplémentées en DHA montraient les profils d'évolution lipidiques les plus comparables à ceux des souris de 6 mois sous régime Std, en particulier une baisse équivalente de la triglycéridémie ($p = 0,8882$) et une diminution significative ($p = 0,0065$) de la variation de la cholestérolémie. Le régime DHA+ semble donc pouvoir contribuer à lutter contre les désordres du métabolisme lipidique observés lors du vieillissement et maintenir les paramètres lipidiques étudiés proches de ceux de souris témoins de 6 mois.

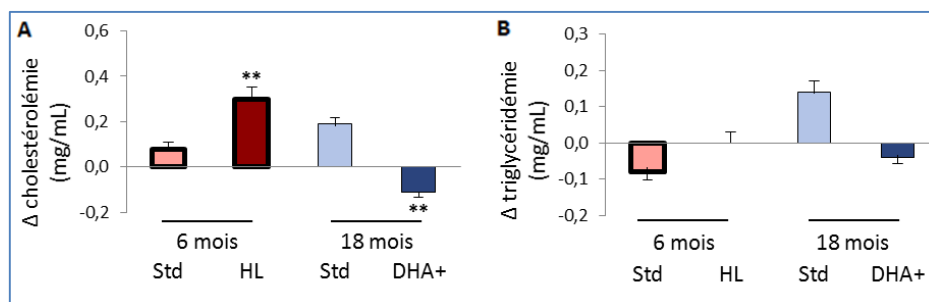


Figure 60 : Effets des différents régimes testés sur les lipides plasmatiques des souris de 6 ou 18 mois

Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe ($N = 11$ pour les souris de 6 mois et $N = 40$ pour les souris de 18 mois). La significativité des différences calculées entre les deux groupes régime est donnée par ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

En conclusion, le suivi de ces divers paramètres nous a permis de mettre en évidence que les souris de 18 mois ayant bénéficié d'une supplémentation même tardive en DHA montraient une cholestérolémie et une triglycéridémie réduites en dépit d'un apport alimentaire et calorique supérieur associé à une augmentation de leur masse corporelle. Ces propriétés hypocholestérolémiantes et hypotriglycéridémiantes bénéfiques du DHA ont été rapportées pour différentes espèces animales, ainsi que pour des groupes de populations humaines présentant une obésité ou une hypertriglycéridémie par exemple, ou étant sous traitement pour corriger leur taux de cholestérol (Robbez Masson *et al.*, 2008 ; Holub, 2009 ; Yurko-Mauro, 2010 ; Golub *et al.*, 2011 ; Tang *et al.*, 2012 ; Guermouche *et al.*, 2014). Ceci pourrait résulter de divers mécanismes induits par les AGPI $n-3$ ou les huiles de poisson, dont le contrôle des gènes de la lipogenèse et de la lipolyse (Allmann and Gibson, 1965 ; Sessler and Ntambi, 1998 ; Kitajka *et al.*, 2002 ; Hajjar *et al.*, 2012 ; Harbeby *et al.*, 2012), et pourrait avoir des conséquences avantageuses pour lutter contre les risques de troubles liés au vieillissement. Le DHA et les autres AGPI de type $n-3$ alimentaires font d'ailleurs l'objet de très nombreuses études qui ont mis en évidence divers effets pléiotropiques bénéfiques sur la santé, associés principalement à des capacités anti-inflammatoires précieuses contre les maladies métaboliques ou liées au vieillissement (Golub *et al.*, 2011 ; Kalupahana *et al.*, 2011). D'autres études ont ainsi mis en évidence un rôle protecteur du DHA contre les maladies métaboliques associées à un effet bénéfique sur les troubles cardiovasculaires. Il a été ainsi montré que

chez le rat, un régime riche en fructose induit une hypertriglycéridémie et une résistance à l'insuline, toutes deux caractéristiques du syndrome métabolique, alors qu'un apport alimentaire parallèle en EPA et DHA stoppait cette insulino-résistance. L'apport alimentaire en AGPI *n-3* prévient ce syndrome pathologique connu pour accroître le risque cardiovasculaire en augmentant la pression artérielle systolique et diastolique ainsi que la pression pulsée, indice de rigidité artérielle (Robbez Masson *et al.*, 2008). Une autre étude prospective sur 3.326 hommes et femmes âgés de plus de 65 ans a montré une corrélation inverse entre les taux circulants de DHA et le risque de développer une fibrillation auriculaire cardiaque (Wu *et al.*, 2012). L'EPA et le DHA semble donc améliorer certaines caractéristiques du syndrome métabolique et du diabète de type 2, principalement en agissant sur la dyslipidémie et l'inflammation, mais probablement aussi sur l'hypertension, l'agrégation plaquettaire et l'état pro-oxydant (Barre, 2007 ; Guermouche *et al.*, 2014). L'EPA et le DHA réduisent la conversion du syndrome métabolique vers le diabète de type 2 et ainsi la mortalité liée à l'infarctus du myocarde induite par l'athérosclérose (Barre, 2007).

Au-delà des effets bénéfiques sur les maladies métaboliques et cardiovasculaires, nous pensons que si une supplémentation nutritionnelle prolongée en DHA peut contribuer à lutter contre la dyslipidémie liée au vieillissement, il est pertinent d'envisager que les autres effets induits par la dyslipidémie puisse être corrigés par le DHA, en particulier les effets centraux observés sur les membranes neuronales.

3. Impact du régime enrichi en DHA sur la composition et la structure des microdomaines membranaires

Afin d'analyser l'impact du régime DHA+ sur l'architecture de la membrane neuronale sur le remodelage des microdomaines membranaires et la distribution des sous-unités du complexe récepteur du CNTF, les microdomaines membranaires corticaux résistants au Triton X-100 ont été séparés par ultracentrifugation en gradient continu de saccharose et identifiés par leur richesse en flotilline-1 et en cholestérol selon les mêmes conditions que décrites précédemment.

Dans un premier temps, nous avons remarqué que dans le groupe de souris sous régime DHA+, la quantité totale de cholestérol présente dans l'ensemble des fractions membranaires obtenues après ultracentrifugation est significativement inférieure (-37%, $p = 0,0114$, [Figure 61](#)) à celle des souris âgées sous régime Std. Cette diminution notée chez les souris de 18 mois supplémentées en DHA permet de retrouver une teneur proche, non statistiquement différente ($p = 0,3643$), de celle obtenue chez les souris de 6 mois sous régime Std.

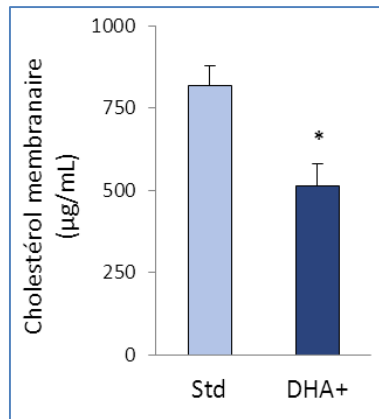


Figure 61 : Effets du régime supplémenté en DHA sur la teneur en cholestérol des membranes corticales des souris de 18 mois

Pour chaque souris, la teneur en cholestérol mesurée dans les fractions membranaires obtenues après ultracentrifugation a été compilée. Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe (N = 6). La significativité des différences calculées entre les deux groupes régimes est donnée par *p<0,05.

Dans un second temps, nous avons observé dans le groupe de souris de 18 mois sous régime DHA+, que diverses sous-populations de rafts se répartissent de manière apparemment désordonnée le long du gradient de saccharose (Figures 62A et 62B).

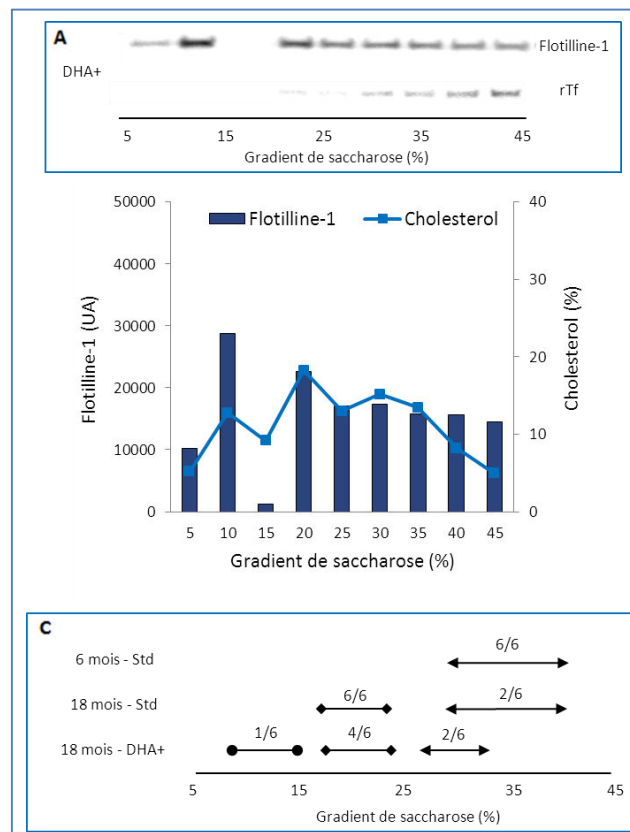


Figure 62 : Effets du régime supplémenté en DHA sur la répartition des microdomaines membranaires de cortex des souris de 18 mois

Le profil présenté correspond à un échantillon des extraits membranaires corticaux représentatif du groupe de souris de 18 mois sous régime supplémenté en DHA (N = 6). Le niveau de cholestérol dans chaque fraction a été rapporté à la quantité totale de toutes les fractions confondues et est exprimé en pourcentage.

La [figure 62C](#) représente l'ensemble de la répartition des rafts en fonction du gradient de saccharose et montre que 1 souris sur 6 présente une sous-population de rafts de très faible densité identifiés dans la fraction à 10% de saccharose. Cette souris ainsi que 3 autres présentent une sous-population de rafts de faible densité dans la fraction à 20% de saccharose et 2 souris sur 6 montrent une sous-population de rafts de haute densité dans la fraction à 30% de saccharose. Les résultats obtenus suggèrent que le régime DHA+ influe effectivement sur les propriétés biophysiques des membranes et induise un remodelage et une redistribution des rafts dans le gradient de saccharose.

L'accrétion du DHA d'origine alimentaire dans les membranes cérébrales semble ne pas éliminer les rafts de faible densité, mais pourrait par contre préserver ceux de haute densité présents chez les souris de 6 mois sous régime Std mais pas sous régime HL ni chez les souris de 18 mois sous régime Std. Diverses études de modélisation ont postulé qu'en raison de son degré élevé d'insaturation, le DHA peut adopter différentes conformations spatiales complexes, ce qui lui procure une structure dynamique (Wassall and Stillwell, 2008). Son incorporation dans les PL et l'enrichissement constaté dans les structures cérébrales de souris sous régime supplémenté en DHA confère une certaine fluidité aux membranes (Guesnet and Alessandri, 2011). Nous proposons donc que le DHA incorporé dans les PL membranaires puisse modifier l'ordre et la taille des rafts, ainsi que leur distribution en favorisant la ségrégation du cholestérol et une délimitation plus claire des domaines rafts ordonnés par rapport aux régions non-rafts dans lesquelles se trouverait préférentiellement le DHA (Brzustowicz *et al.*, 2002 ; Shaikh and Teague, 2012). L'incorporation membranaire du DHA pourrait perturber la répartition du cholestérol et ainsi favoriser une dislocation des rafts. L'hypothèse d'une augmentation de la fluidité des régions non-rafts de la membrane pourrait alors expliquer les profils hétérogènes des rafts observés chez les souris sous régime DHA+.

4. Impact du remodelage membranaire lié au régime enrichi en DHA sur le complexe récepteur CNTF-R et son activité

Afin d'étudier l'impact de la supplémentation en DHA sur la distribution des sous-unités du récepteur du CNTF dans les rafts chez la souris âgée, les niveaux protéiques de LIFR β et CNTFR α ont été analysés par immunoblot ([Figure 63A](#)). Ces niveaux ont été comparés à ceux des souris de 18 mois sous régime Std ajustés à 100%. Les taux de LIFR β ([Figure 63B](#)) et de CNTFR α ([Figure 63C](#)) sont respectivement de $140 \pm 8 \%$ ($p = 0,0676$) et de $180 \pm 6 \%$ ($p = 0,0476$) dans les rafts des souris de 18 mois sous régime DHA+, gp130 étant trop peu abondante dans les rafts pour être détectée ainsi. Comme nous l'avons vérifié lors de l'étude des effets et de l'âge ou ceux du régime HL sur les souris de 6 mois, nous avons aussi pu observer que le régime DHA+ n'avait pas modifié les niveaux relatifs de ces protéines dans les fractions membranaires corticales des souris de 18 mois : LIFR β ($p = 0,9992$), CNTFR α ($p = 0,9902$) et flotilline-1 ($p = 0,1072$).

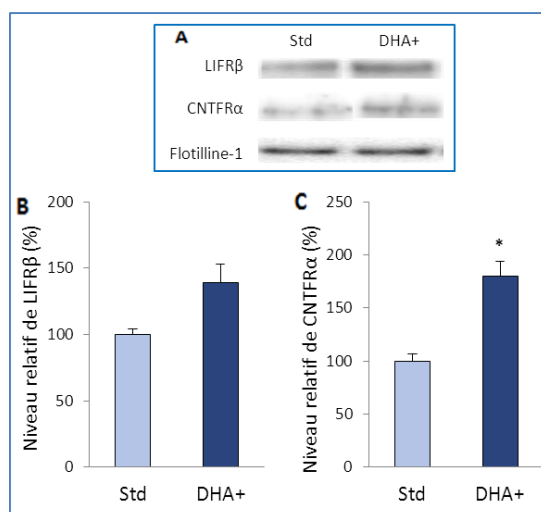


Figure 63 : Effets du régime supplémenté en DHA sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans les rafts corticaux des souris de 18 mois

Le niveau relatif des protéines LIFRβ et CNTFRα évalué par analyse densitométrique des immunoblots a été normalisé par rapport à la flotilline-1 et comparé au niveau protéique relatif calculé au sein du groupe de souris âgées de 18 mois sous régime standard utilisé comme référence et considéré égal à 100%. Les valeurs représentées sont les moyennes ± SEM par groupe (N= 6). La significativité des différences calculées entre les deux groupes régimes est donnée par *p<0,05.

Comme précédemment, nous avons rassemblé dans une même figure les résultats concernant les niveaux de LIFRβ (Figure 64A) et CNTFRα (Figure 64B) mesurés sous régime HL ou DHA+ ainsi que les témoins correspondants sous régime Std afin d’avoir une vue d’ensemble des effets de l’âge (6 et 18 mois) et de l’alimentation (régime) sur le remaniement protéique au sein des rafts. Pour plus de clarté, seules ont été représentées les significativités par rapport au groupe de souris de 6 mois sous régime Std qui a été considéré comme témoin et représenté par la ligne pointillée à 100%.

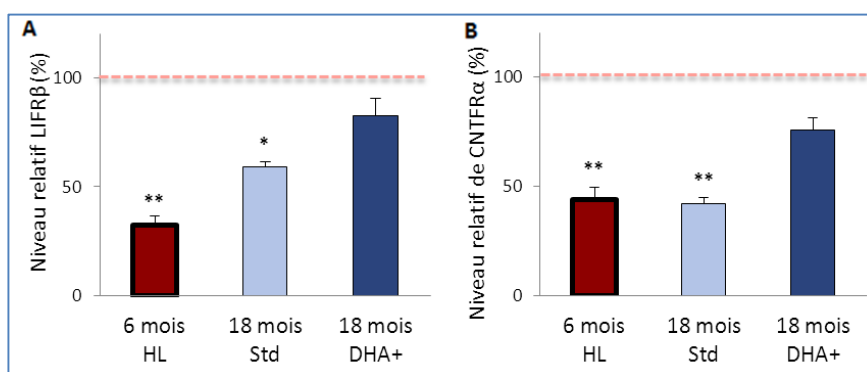


Figure 64 : Effets des différents régimes testés sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans les rafts corticaux des souris de 6 ou 18 mois

Le niveau relatif des protéines LIFRβ et CNTFRα évalué par analyse densitométrique des immunoblots a été normalisé par rapport à la flotilline-1 et comparé au niveau protéique relatif calculé au sein du groupe de souris âgées de 6 mois sous régime standard utilisé comme référence et considéré égal à 100%. Les valeurs représentées sont les moyennes ± SEM par groupe (N= 6). La significativité des différences calculées avec le groupe référence est donnée par *p<0,05 et **p<0,01.

Les souris de 6 mois sous régime HL présentent une diminution significative des niveaux protéiques de LIFRβ ($p = 0,0012$) et CNTFRα ($p = 0,0018$), tout comme les souris de 18 mois sous régime Std (respectivement, $p = 0,0407$ et $p = 0,0014$). Ces données avaient alors permis de suggérer que le

vieillessement ou un apport alimentaire déséquilibré en lipides puissent tous deux induire chez la souris un remaniement protéique au sein des rafts qui puisse expliquer le défaut de réponse au CNTF. En revanche, comparées aux souris de 6 mois sous régime Std, les souris de 18 mois sous régime DHA+ n'ont pas montré de différences significatives des niveaux de LIFR β ($82,4 \pm 20,1\%$, $p = 0,5714$) et de CNTFR α ($75,5 \pm 13,9\%$, $p = 0,2043$). Ceci pourrait signifier que l'incorporation membranaire de DHA contribue à préserver des microdomaines dont la composition serait stabilisée lors du vieillissement, préservant ainsi la présence cohérente des protéines requises dans les rafts comme les sous-unités du récepteur du CNTF.

Ces résultats semblent donc montrer que même si la supplémentation alimentaire en DHA ne génère pas chez les souris âgées un profil de rafts corticaux parfaitement identique à celui des souris jeunes, le remodelage membranaire induit permet de préserver LIFR β et CNTFR α dans les rafts. Nous avons montré précédemment que cette localisation est nécessaire pour l'assemblage efficace des sous-unités du complexe récepteur CNTF-R et indispensable à son activation par le CNTF. L'exclusion des sous-unités hors des rafts pouvait ainsi expliquer la signalisation défailante constatée chez les souris dyslipidémiques ou âgées. Il nous fallait valider alors les conséquences fonctionnelles de ces remodelages et vérifier les effets bénéfiques du régime DHA+ sur la fonctionnalité du récepteur et l'activation par le CNTF des voies de signalisation neuroprotectrices.

Tout d'abord, une analyse par immunoblot a permis de montrer que le régime DHA+ ne modifiait pas les niveaux protéiques des trois sous-unités du récepteur du CNTF dans les homogénats totaux de cortex ou d'hippocampe des souris (Figure 65). Aucune différence significative entre les deux groupes de souris n'a été observée pour chacune des sous-unités LIFR β ($p = 0,0668$), gp130 ($p = 0,7605$) et CNTFR α ($p = 0,2394$).

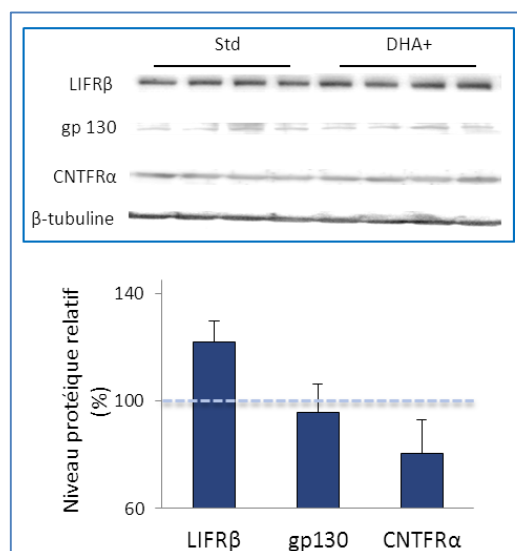


Figure 65 : Effets du régime supplémenté en DHA sur les niveaux protéiques des sous-unités du CNTF-R dans les homogénats totaux d'hippocampe des souris de 18 mois

Le niveau relatif des protéines LIFR β , gp130 et CNTFR α évalué par analyse densitométrique des immunoblots a été normalisé par rapport à la β -tubuline et comparé au niveau protéique relatif calculé au sein du groupe de souris âgées de 18 mois sous régime standard utilisé comme référence et représenté par la ligne pointillée à 100%. Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe (N= 6).

La signalisation du CNTF a donc été étudiée en suivant l'activation des voies de STAT₃ et ERK_{1/2} par la mesure des niveaux de phosphorylation des protéines STAT₃ et ERK_{1/2} dans l'hippocampe 3 h après l'injection icv du facteur neurotrophique. Six groupes de 6 souris ont été constitués et séparés en deux sous-groupes de 3 souris chacun, soumises respectivement à l'injection du CNTF ou de la solution véhicule. Les différents sous-groupes ont été comparés aux souris de 18 mois sous régime Std considérés comme témoins, dont les niveaux ont été ajustés à 100% et représentés par la ligne pointillée. La voie principale de transduction du CNTF, celle de STAT₃, a montré une activité augmentée significativement (+168 ± 18 %, $p = 0,0045$) chez les souris de 18 mois sous régime DHA+ (Figures 66A et 66B). De façon cohérente, l'activation de l'autre voie importante, celle d'ERK_{1/2}, était aussi significativement augmentée (+251 ± 32%, $p = 0,0071$), dans ce même groupe de souris (Figures 66C et 66D).

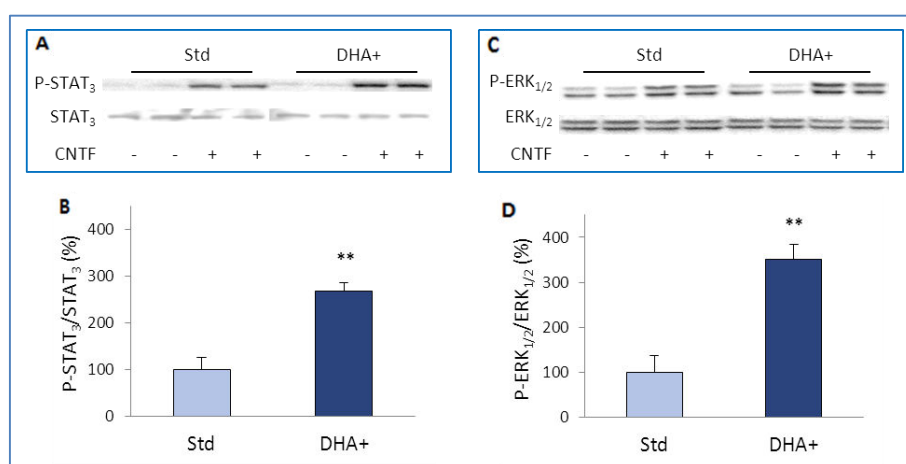


Figure 66 : Effets du régime supplémenté en DHA sur l'activation par le CNTF des voies de transduction de STAT₃ et ERK_{1/2} dans l'hippocampe des souris de 18 mois

Les proportions des formes phosphorylées P-STAT₃ et P-ERK_{1/2} ont été normalisées par rapport aux teneurs totales de protéines STAT₃ et ERK_{1/2}, phosphorylées et non, évaluées par analyse densitométrique des immunoblots. L'activation des voies a été mesurée en prenant en compte la différence de ces proportions entre les souris ayant subi l'injection de solution véhicule et celles ayant subi l'injection de CNTF. Les figures B et D ont été réalisées en exprimant les taux relatifs de P-STAT₃ et P-ERK_{1/2} chez les souris de 18 mois sous régime supplémenté en DHA comparativement à ceux des souris sous régime standard considérés comme références, ajustés à 100%. Les valeurs représentées sont les moyennes ± SEM par groupe (N = 3). La significativité des différences calculées entre les deux groupes régimes est donnée par ** $p < 0,01$.

Les résultats d'activation des voies de STAT₃ (Figure 67A) et ERK_{1/2} (Figure 67B) ont été compilés sur un même graphe pour comparer plus facilement les effets des différentes conditions d'âge et de régime sur la réponse au CNTF. Les résultats d'activation ont été normalisés par rapport à ceux du groupe témoin, celui des souris de 6 mois sous régime Std, représentés par la ligne pointillée ajustée à 100% et seules les significativités par rapport à ce groupe ont été représentées. Les souris de 6 mois sous régime HL présentaient donc une diminution significative de la signalisation induite par le CNTF par les voies de STAT₃ ($p = 0,0402$) et d'ERK_{1/2} ($p = 0,0056$), tout comme les souris de 18 mois sous régime Std (respectivement, $p = 0,0175$ et $p = 0,0013$). Ces données avaient permis de conclure que chez la souris, la dyslipidémie et le vieillissement induisaient chacun un défaut de réponse au CNTF. En revanche, le groupe des souris de 18 mois ayant bénéficié du régime riche en DHA se distingue très clairement des autres en montrant par

rapport au groupe témoin une augmentation significative de plus de 50% de l'activation des voies de STAT₃ ($p = 0,0144$) et d'ERK_{1/2} ($p = 0,0475$) en réponse au CNTF.

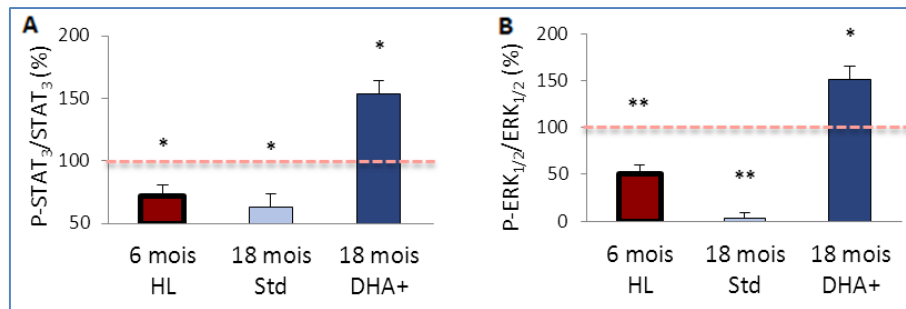


Figure 67 : Effets des différents régimes testés sur l'activation par le CNTF des voies de transduction de STAT₃ et ERK_{1/2} dans l'hippocampe des souris de 6 ou 18 mois

Les proportions des formes phosphorylées P-STAT₃ et P-ERK_{1/2} ont été normalisées par rapport aux teneurs totales de protéines STAT₃ et ERK_{1/2} phosphorylées et non, évaluées par analyse densitométrique des immunoblots. L'activation des voies a été mesurée en prenant en compte la différence de ces proportions entre les souris ayant subi l'injection de solution véhicule et celles ayant subi l'injection de CNTF. Les figures ont été réalisées en exprimant les taux relatifs de P-STAT₃ et P-ERK_{1/2} chez les souris des différents groupes comparativement à ceux des souris de 6 mois sous régime standard considérés comme références, ajustés à 100% et représentés par les barres en pointillé. Les valeurs représentées sont les moyennes ± SEM par groupe (N = 5 pour le régime hyperlipidique et N = 3 pour les autres groupes). La significativité des différences calculées avec le groupe de référence est donnée par * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

En conclusion, nos résultats suggèrent que l'apport alimentaire de DHA à la souris âgée puisse préserver la fonctionnalité de protéines membranaires cérébrales, parmi lesquelles des cibles thérapeutiques potentielles comme le récepteur du CNTF. Cette faculté est liée, au moins en partie, au maintien lors du vieillissement d'un niveau protéique stable des sous-unités du complexe CNTF-R au sein des rafts des membranes neuronales, garantissant la capacité de constituer le complexe actif en réponse au CNTF au moins aussi efficacement qu'une souris jeune. Par extension, nous pensons qu'un apport nutritionnel approprié de DHA peut préserver les propriétés essentielles en lien avec les fonctions synaptiques et cognitives, limitant ainsi le vieillissement cérébral et l'un de ses principaux facteurs de risque, les dyslipidémies. Ces résultats apportent une preuve supplémentaire à l'hypothèse qu'une perturbation de la composition lipidique impacte l'architecture et la fonctionnalité des membranes, et plus particulièrement celles des rafts.

Les voies de signalisation comme celles de STAT₃ et ERK_{1/2} étant activées au niveau de la membrane plasmique, il est logique d'imaginer qu'elles soient influencées de façon déterminante par l'organisation et les propriétés de la bicouche lipidique et en particulier des microdomaines. Nos résultats illustrent bien que leur perturbation sous l'effet du vieillissement ou d'une dyslipidémie modifie la régulation de ces voies. L'apport alimentaire de DHA, capable de remodeler les membranes neuronales, semble pouvoir atténuer ces perturbations et l'impact du vieillissement sur les voies de signalisation associées au CNTF. Le DHA est bien connu pour son influence sur les propriétés structurales et fonctionnelles des membranes et des rafts telles que la fluidité, la perméabilité, l'élasticité, les propriétés de fusion et la distribution des protéines associées (Wassall and Stillwell, 2009 ; Yaqoob and Shaikh, 2010 ; Shaikh and Teague, 2012).

Certains auteurs suggèrent d'ailleurs que la formation de ces rafts et leur ségrégation soient au moins en partie induites par un partage d'affinité résultant de l'incompatibilité physicochimique et stérique entre le cholestérol et les AGPI *n-3* (Wassall and Stillwell, 2009), même si la littérature n'a pas encore écarté l'éventualité que le DHA et l'EPA puissent aussi être incorporés dans les rafts (Li *et al.*, 2005 ; Wassall and Stillwell, 2009 ; Shaikh and Teague, 2012) et nos résultats ne permettent pas réellement de trancher sur cette question. En revanche, ils confirment la capacité du DHA d'origine alimentaire de moduler l'organisation des rafts. L'incorporation de DHA et plus largement l'enrichissement membranaire en AGPI doit impacter sur le processus de séparation de phases, avec à la clé la redistribution locale des lipides (notamment une hausse des teneurs en PE riches en DHA), un remodelage des membranes et un déplacement sélectif des protéines (Brzustowicz *et al.*, 2002). La mobilisation des sous-unités du complexe CNTF-R au sein des rafts est l'une des clés de la réponse au CNTF et les effets du DHA sur le remodelage membranaire sont certainement à la base aussi de ses propriétés neurotrophiques et neurogéniques, qui imposent la présence dans les rafts de récepteurs des facteurs de croissance et des neurotrophines, ainsi que des autres protéines impliquées dans la transduction des signaux qu'ils génèrent. Entre autres conséquences, ce remodelage pourrait assurer des capacités de plasticité cérébrale suffisantes pour lutter contre les effets néfastes du vieillissement en préservant l'efficacité des voies de signalisation associées à la neurogenèse et/ou à la survie cellulaire. Ces mécanismes pourraient expliquer de façon cohérente le mode d'action du DHA dans certains processus physiopathologiques tels que le développement et la maturation du SNC, 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 comme BACE1 et les présénilines PSEN1/PSEN2 (Florent-Bécharde *et al.*, 2007 ; Sebastião *et al.*, 2013 ; Fabelo *et al.*, 2014).

5. Impact du remodelage membranaire induit par le DHA sur la fonctionnalité cérébrale

Afin d'investiguer la fonctionnalité synaptique, l'hippocampe de l'hémisphère droit des souris a été utilisé pour isoler la fraction brute (non purifiée) de synaptosomes en vue d'analyses de composition protéique des synapses par immunoblot. Considérant leur intérêt comme marqueurs de l'intégrité des synapses, nous avons choisi la protéine présynaptique SNAP-25 et la protéine post-synaptique PSD-95, ainsi que la synaptophysine, la synaptotagmine et GluR1, sous-unité du récepteur AMPA. La synaptophysine est une protéine transmembranaire des vésicules présynaptiques, impliquée dans la formation de vésicules synaptiques et dans l'exocytose des neurotransmetteurs. L'apparition de la synaptophysine permet classiquement de suivre l'acquisition du phénotype neuronal durant la maturation cérébrale (Bailey and Lahiri, 2006 ; Gottschall *et al.*, 2010). La synaptotagmine est elle aussi une protéine de la membrane des vésicules synaptiques. Activée par l'entrée de calcium à la suite d'une stimulation, elle s'associe au complexe SNARE à la membrane plasmique, permettant ainsi la fusion des membranes et la libération des neurotransmetteurs dans l'espace synaptique (Galli *et al.*, 2002). Enfin, GluR1 est une protéine

membranaire post-synaptique, appartenant à la famille des canaux ioniques dépendants du glutamate, qui agit comme un neurotransmetteur excitateur dans de nombreuses synapses du SNC. Ces récepteurs subissent un trafic cellulaire intense et interviennent dans les phénomènes de plasticité synaptique (Mondin *et al.*, 2011). L'analyse par immunoblot des niveaux protéiques de PSD-95, SNAP-25 et synaptophysine dans l'hippocampe des souris de 18 mois a révélé une augmentation très significative pour les souris sous régime DHA+ par rapport à celles sous régime Std (Figure 68), respectivement de 37% ($p < 0,0001$), 45% ($p < 0,0001$) et 30% ($p = 0,0008$), ainsi qu'une tendance à l'augmentation pour la protéine GluR1 ($p = 0,0602$) sans changement notable pour la protéine synaptotagmine ($p = 0,7288$).

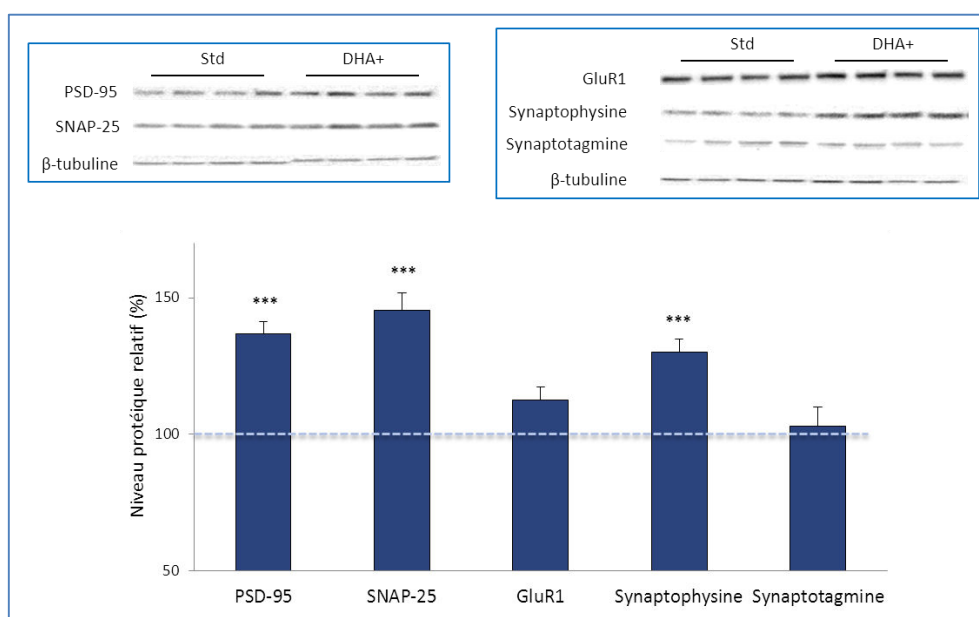


Figure 68 : Effets du régime supplémenté en DHA sur les niveaux de protéines synaptiques dans la fraction brute de synaptosomes d'hippocampe des souris de 18 mois

*Le niveau relatif des protéines synaptiques évalué par analyse densitométrique des immunoblots a été normalisé par rapport à la β-tubuline, en considérant que l'expression protéique du groupe de souris âgées de 18 mois sous régime standard utilisé comme référence et représenté par la ligne pointillée à 100%. Les valeurs représentées sont les moyennes ± SEM par groupe (N= 8). La significativité des différences calculées entre les deux groupes régimes est donnée par *** $p < 0,001$.*

En conclusion, l'analyse des niveaux de protéines synaptiques et le suivi de la signalisation induite par le CNTF nous ont permis de dresser un bilan des capacités fonctionnelles cérébrales des souris âgées de 18 mois. Le groupe de souris ayant bénéficié du régime supplémenté en DHA montrait des niveaux de protéines synaptiques supérieurs pouvant témoigner de meilleures capacités cérébrales, et une préservation de la réponse au CNTF, évaluée supérieure même à celle des souris de 6 mois sous régime standard. Le DHA semble donc capable de prévenir ou ralentir efficacement le vieillissement cérébral.

Le DHA est l'acide gras prédominant dans les phospholipides des membranes excitables des neurones, ce qui en fait un constituant essentiel pour la maturation du SNC et pour la préservation des fonctions neuronales tout au long de la vie et en particulier au cours du vieillissement (Uauy and Dangour, 2006). De nombreuses études portent d'ailleurs sur l'effet du DHA sur les troubles cognitifs des personnes âgées. Il a par exemple été rapporté les personnes présentant des troubles cognitifs liés au vieillissement

consomment un régime alimentaire généralement plus pauvre en DHA (Solfrizzi *et al.*, 2010), alors la consommation de poissons gras ou de DHA diminue le risque de troubles cognitifs liés au vieillissement et améliore les performances de personnes atteintes de troubles cognitifs légers (Yurko-Mauro *et al.*, 2010b). Cependant, d'autres études n'arrivent pas à prouver une telle association (Cole *et al.*, 2009 ; Dangour *et al.*, 2010). Les auteurs de ces résultats attribuent cette divergence à diverses causes comme la taille de l'échantillon, l'hétérogénéité des populations, la difficulté à déterminer précisément les apports alimentaires en AGPI *n-3*, ainsi que la durée et la précocité du traitement (Cole and Frautschy, 2006 ; Jicha and Markesbery, 2010 ; Solfrizzi *et al.*, 2010 ; Morris, 2012). Une autre étude explique cette divergence par une dérégulation de l'homéostasie du DHA survenant au cours du vieillissement (Castellano and Cunnane, 2012). En effet, il a été décrit que les concentrations plasmatiques de DHA chez les personnes âgées ont parfois tendance à être plus élevées, en raison d'un temps de transit accru dans le sang circulant qui, de fait, modifie l'importance de sa β -oxydation et de sa rétroconversion. Ceci suggère que les niveaux plasmatiques de DHA plus élevés chez les personnes âgées ne reflètent pas nécessairement une plus grande consommation ni un meilleur rendement métabolique, mais résultent plutôt d'un ralentissement de l'approvisionnement du DHA au cerveau (Castellano and Cunnane, 2012).

Plusieurs études se sont intéressées aux effets des AGPI *n-3* sur l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs. Il a été décrit que l'administration d'un régime enrichi en AGPI *n-3* à des souris femelles C57Bl/6 avant l'accouplement, pendant la grossesse et jusqu'au sevrage augmente significativement le taux de DHA dans les phospholipides du cortex cérébral de la progéniture, ainsi que les niveaux des ARNm de NGF, de BDNF et de TrkB, tout comme l'activation de la voie de signalisation impliquant CREB (*C-AMP response element-binding protein*) (Balogun and Cheema, 2014 ; Sable *et al.*, 2014). Par contre, un déficit en ces AG chez le rat provoque l'effet inverse (Bhatia *et al.*, 2011 ; Bach *et al.*, 2014 ; Sable *et al.*, 2014). Des corrélations positives entre les niveaux de DHA et de TrkB actif ont été identifiées dans le cortex frontal, l'hypothalamus et l'hippocampe des animaux. La perte de ces corrélations peut d'ailleurs être associée au développement de troubles psychiatriques tels que la dépression et les traitements actuels contre l'anxiété visent souvent à favoriser l'action du BDNF et de son récepteur (Bhatia *et al.*, 2011). Un effet antidépresseur comparable a été rapporté chez la souris adulte soumise à un traitement chronique par l'ALA, ainsi qu'une augmentation de la neurogenèse et de la différenciation neuronale corrélée à une production accrue de BDNF (Blondeau *et al.*, 2009). Ces études suggèrent qu'un régime alimentaire déséquilibré en AGPI *n-3* influence l'expression des gènes des neurotrophines, de leurs récepteurs et de leurs molécules de signalisation, et exerce des effets préjudiciables sur l'état cognitif et la susceptibilité à l'anxiété et la dépression (Blondeau *et al.*, 2009 ; Bhatia *et al.*, 2011 ; Bach *et al.*, 2014 ; Sable *et al.*, 2014). Les AGPI *n-3*, en particulier le DHA et l'EPA, peuvent aussi intervenir sur la voie de signalisation de STAT₃. En effet, une étude a montré leur capacité à moduler l'expression de la protéine C réactive induite par l'IL-6 en réduisant l'activité transcriptionnelle de son promoteur génique dans un modèle de cellules hépatiques en culture (Wang *et al.*, 2013). Le DHA et l'EPA diminuent la liaison de l'IL-6 à STAT₃ dont ils empêchent ainsi l'activation

par phosphorylation, mécanisme qui pourrait expliquer l'effet anti-inflammatoire des AGPI *n-3*. En résumé, si la littérature rapporte que le DHA peut influencer sur la fonction des neurotrophines en modulant leurs niveaux d'expression ou en régulant les cascades des voies de signalisation associées, nos résultats complètent les connaissances en montrant son impact sur les propriétés des membranes neuronales.

B. Le DHA, un facteur de protection contre le stress amyloïde et le déclin cognitif, capable de potentialiser la réponse au CNTF

1. Démarche expérimentale

Après avoir validé qu'une supplémentation adaptée en DHA permettait de restaurer la colocalisation des sous-unités du complexe récepteur CNTF-R et la signalisation induite par le CNTF par l'intermédiaire d'un remodelage membranaire chez la souris âgée, nous avons voulu vérifier que le DHA pouvait aussi améliorer les effets pharmacologiques du CNTF, en particulier la neuroprotection d'un modèle de MA développé au laboratoire. Caractérisé par des altérations synaptiques associées à des troubles mnésiques suite à l'injection icv de peptide A β soluble (A β s), ce modèle nous avait permis de valider l'effet neuroprotecteur du CNTF et le potentiel thérapeutique des voies de signalisation associées comme une approche anti-MA prometteuse (Garcia *et al.*, 2010). Des études préalables nous avaient conduits à observer que les résultats très significatifs obtenus chez des souris jeunes sont très atténués chez les souris âgées, suggérant que le cerveau âgé répond moins efficacement aux traitements anti-MA. Nous avons donc cherché à vérifier si l'effet bénéfique du CNTF pouvait être amélioré chez les souris âgées soumises pendant 10 semaines au régime DHA+ considéré comme un traitement adjuvant préventif. Les deux groupes de 40 souris C57Bl/6J de 18 mois placés sous régime Std ou DHA+ ont été soumis à une injection stéréotaxique icv d'A β s ou de la solution véhicule. Dans cette étude, le groupe véhicule était donc considéré comme le groupe témoin, modèle de vieillissement sans pathologie, alors que le groupe A β représentait le groupe modèle de MA. Un troisième groupe de souris, soumis à l'injection icv seule de CNTF, constituait le groupe témoin CNTF, tandis que le dernier groupe, soumis à une injection de peptide A β s puis de CNTF était considéré comme le groupe modèle de MA traité par le CNTF. L'impact du stress amyloïde induit par les oligomères d'A β s a été évalué comparativement entre les souris des différents groupes-régimes et sous-groupes. Le scénario expérimental illustré par la [figure 69](#) a été suivi pour l'investigation chronologique de la mémoire à court terme (en labyrinthe en Y), puis des capacités d'apprentissage et enfin de la mémoire à long terme (en piscine de Morris).

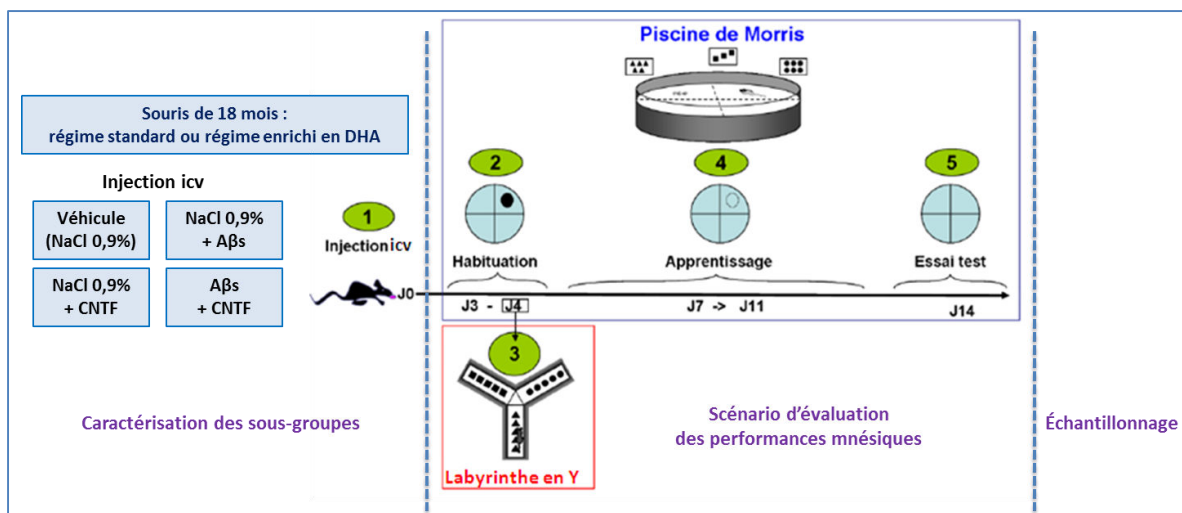


Figure 69 : Caractérisation des sous-groupes et scénario d'évaluation des performances mnésiques des souris

2. Effets du DHA et du CNTF sur les capacités mnésiques et cognitives des souris modèles de la MA

a. Évaluation de la mémoire à court terme

Les capacités de mémoire à court terme des souris de 18 mois des différents sous-groupes ont été évaluées à partir de la mesure du taux d'alternance dans le labyrinthe en Y. Nous avons tout d'abord vérifié pour chaque régime que l'injection de solution saline ou de CNTF n'induisaient aucune différence significative, avec un taux d'alternance moyen de $70,5 \pm 0,8\%$, sensiblement identique à celui des souris de 3 mois (Youssef *et al.*, 2008 ; Desbène *et al.*, 2012). Le taux d'alternance moyen des souris du groupe véhicule soumises à l'injection de la solution saline ($68,3 \pm 1,2\%$) a servi de témoin et a été représenté par la ligne pointillée (Figure 70).

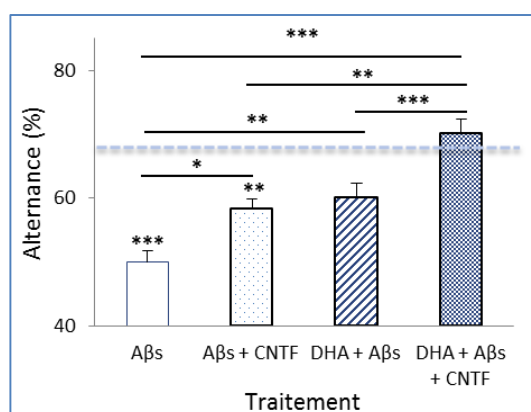


Figure 70 : Effets du régime supplémenté en DHA et du CNTF sur la mémoire à court terme des souris de 18 mois

Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe (N = 9). Elles ont été comparées entre tous les groupes et notamment vis-à-vis du groupe de souris de 18 mois ayant subi l'injection de la solution véhicule, dont l'alternance calculée est représentée par la ligne pointillée. La significativité des différences calculées entre les groupes est donnée par * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

L'injection icv des oligomères A β s a induit une baisse de 28,6% très significative ($p < 0,0001$) du taux d'alternance à 50,0% pour les souris âgées modèles de MA, confirmant la survenue d'un stress amyloïde délétère pour la mémoire à court terme (Figure 70). Il est important de souligner que cette même injection chez des souris jeunes, à 3 mois d'âge, abaisse le taux d'alternance de 15% environ (données non publiées), de façon moins marquée donc, suggérant que les souris âgées sont plus sensibles au stress amyloïde que les souris jeunes.

L'injection de CNTF n'avait produit aucun effet particulier dans les souris témoins. En revanche, elle a visiblement permis de limiter la toxicité des oligomères A β s, avec une baisse significative de l'alternance à 58,4% plus faible, de 16,6% ($p = 0,0014$), par rapport aux souris âgées témoins. Ceci semble illustrer un effet neuroprotecteur partiel du CNTF contre le stress amyloïde, confirmé par l'amélioration significative du taux d'alternance, de 12% ($p = 0,0063$), par rapport aux souris âgées modèles de MA (Figure 70). Le CNTF seul n'a donc pas pu restaurer complètement les capacités mnésiques des souris âgées soumises à un stress amyloïde.

Ces mêmes traitements ont aussi été appliqués aux souris sous régime DHA+. Chez ces dernières, l'injection des oligomères A β s s'est soldée par une baisse du taux d'alternance à 60,1%, non significative ($p = 0,1298$) par rapport au groupe témoin (Figure 70). La baisse du taux d'alternance induite par l'injection d'A β s s'est avérée significativement plus faible ($p = 0,0023$) chez les souris supplémentées en DHA que chez celles sous régime Std. Le stress amyloïde généré était donc certainement plus marqué chez ces dernières, puisque la mémoire à court terme était moins altérée chez les souris sous régime DHA+, illustrant le rôle protecteur que le DHA assure contre la toxicité des oligomères A β s.

L'intérêt de la supplémentation en DHA pour prévenir les effets toxiques de l'exposition à ces oligomères est apparu de façon plus spectaculaire encore en présence de CNTF, puisqu'une protection totale contre le stress amyloïde a été constatée, avec un taux d'alternance de 70,1%, identique à celui des souris témoins ($p = 0,9174$). L'association du DHA et du CNTF a permis d'améliorer significativement la mémoire à court terme par rapport au DHA ($p = 0,0249$) et au CNTF ($p = 0,0042$) utilisés individuellement. Au-delà des propriétés neuroprotectrices connues du DHA et du CNTF, l'originalité de ces résultats réside au niveau du fait qu'ils peuvent exercer des effets synergiques qui semblent protéger complètement le cerveau de la souris âgée exposée aux oligomères A β s dans le modèle MA de vieillissement cérébral pathologique. L'enrichissement en DHA des membranes cérébrales consécutif à la supplémentation par le régime DHA+ a permis de potentialiser la réponse au CNTF, nettement plus marquée ($p = 0,0042$) que dans les souris sous régime Std. Ceci suggère que l'incorporation du DHA dans la bicouche ait permis de préserver le récepteur CNTF-R dans le contexte membranaire approprié favorisant son assemblage et son activation. Le régime alimentaire riche en DHA pourrait ainsi compléter et améliorer les effets anti-MA du CNTF au point de préserver les capacités cognitives des souris de 18 mois à des niveaux comparables à celles des souris jeunes adultes de 3 mois.

b. Analyse des capacités d'apprentissage

Nous avons poursuivi le scénario d'évaluation cognitive en étudiant l'apprentissage d'une tâche programmée du 7^{ème} au 14^{ème} jours après l'injection, en mesurant le délai nécessaire à chaque souris, préalablement habituée à cet exercice, pour rejoindre la plateforme immergée sur la base des repères spatiaux environnant la piscine de Morris. Les délais mesurés lors du 1^{er} jour de la phase d'apprentissage du groupe des souris âgées témoins ayant subi l'injection de véhicule ont été ajustés à 100% pour chaque régime, afin de s'affranchir des différences intergroupes liées au hasard avant l'apprentissage. Les performances des jours suivants sont donc exprimées en délais relatifs. Les souris ont en effet débuté cette phase avec des capacités distinctes, puisqu'à J1, 1^{er} jour de l'apprentissage, les souris du groupe sous régime Std trouvaient la plateforme en $26,4 \pm 3,2$ s, alors que les souris du groupe sous régime DHA+ nécessitaient $30,5 \pm 3,3$ s ($p = 0,5919$). Par contre, après 5 jours de tests répétés, les souris des deux groupes régimes étaient capables d'atteindre la plateforme en moins d'une quinzaine de secondes, témoignant de leur capacité d'apprentissage. Le délai mesuré à J5 était significativement réduit de 54% ($p = 0,0059$) pour le groupe sous régime Std et de 63% ($p = 0,0002$) pour le groupe sous régime DHA+ (Figure 71). Les performances de ces dernières étant apparues à peine meilleures mais non significativement ($p = 0,5420$), il semble que les régimes alimentaires comparés ici n'exercent que peu d'influence, voire aucune, sur les capacités d'apprentissage des souris âgées témoins.

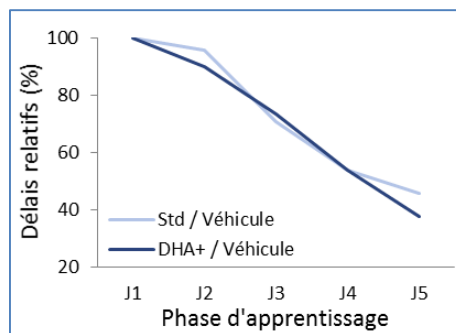


Figure 71 : Effets du régime supplémenté en DHA sur les capacités d'apprentissage des souris de 18 mois

Les valeurs représentées sont les moyennes des délais mesurés de J1 à J5 pour chaque groupe ($N = 9$), exprimés proportionnellement au délai moyen mesuré à J1 pour les souris sous le même régime et ajusté à 100%. Valeurs mesurées à J1 : $26,4 \pm 3,2$ s et $30,5 \pm 3,3$ s pour les groupes Std / véhicule et DHA+ / véhicule.

Nous avons considéré que les résultats de ce test seraient plus précis en ignorant les délais relatifs mesurés à J5, peu informatifs et discriminants car très peu ou pas différents de ceux à J4 en raison de performances limitées par les capacités de nage des souris de 18 mois et d'une perte de motivation observée chez les individus des deux groupes. Aussi, les résultats présentés ci-après ne tiendront compte que des quatre premiers jours d'apprentissage. Par souci de clarté aussi, nous avons choisi de ne pas représenter les barres d'erreurs qui traduisaient des variations interindividuelles relativement importantes, de 9,2 à 15,6%.

L'impact de l'exposition aux oligomères A β s a ensuite été évalué sur les capacités d'apprentissage des souris. L'analyse des profils tracés à partir des délais relatifs mesurés montre des pentes plus faibles pour les souris exposées que pour les souris témoins au sein du groupe sous régime Std (Figure 72A). Entre J1 et J4 en effet, le délai moyen avait significativement diminué de 46% ($p = 0,0093$) pour le groupe véhicule et de 21% seulement ($p = 0,3777$) pour le groupe A β s. Ces différences marquées à J4, bien que non significatives ($p = 0,0971$), entre les deux sous-groupes, s'expliquent par le fait que l'exposition aux oligomères A β s s'est soldée par un stress amyloïde qui a altéré les capacités d'apprentissage, certainement en conséquence de dysfonctionnements des réseaux neuronaux impliqués dans les processus mnésiques. Les souris exposées nécessitaient alors des délais pour rejoindre la plateforme plus longs que les souris témoins qui apprenaient mieux la tâche imposée. Pour les souris sous régime DHA+ (Figure 72B), le délai moyen était réduit significativement de 46% ($p = 0,0018$) pour le groupe véhicule et de 42% ($p = 0,0020$) pour le groupe A β s. Cette différence à J4 entre les deux sous-groupes est non significative ($p = 0,4078$). De toute évidence, le régime DHA+ a permis de limiter le stress amyloïde induit par les oligomères A β s et les souris exposées présentaient alors des performances d'apprentissage tout à fait comparables à celles des souris témoins. Le régime DHA+ a donc été capable de préserver ces capacités mnésiques et de mener à une neuroprotection contre la toxicité du stress amyloïde.

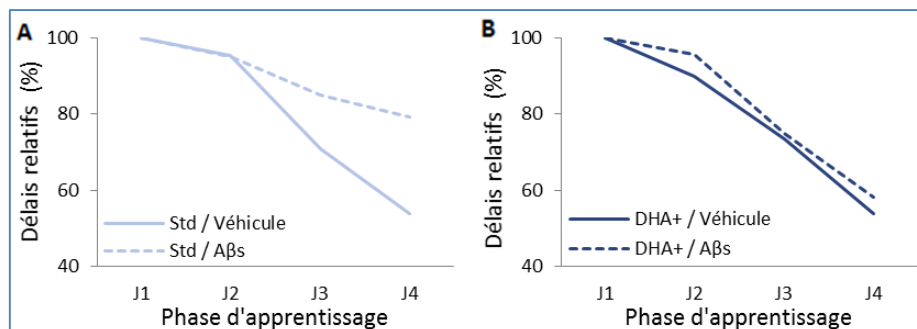


Figure 72 : Effets du régime supplémenté en DHA sur l'impact des oligomères A β s sur les capacités d'apprentissage des souris de 18 mois

(A) Souris sous régime standard ; (B) Souris sous régime DHA+. Les valeurs représentées sont les moyennes des délais mesurés de J1 à J4 pour chaque groupe ($N = 9$), exprimés proportionnellement au délai moyen mesuré à J1 pour les souris sous le même régime et ajusté à 100%. Valeurs mesurées à J1 : 26,4 \pm 3,2 s pour le sous-groupe Std/véhicule, 30,2 \pm 3,2 s pour le sous-groupe Std/A β s, 30,5 \pm 3,3 s pour le sous-groupe DHA+/véhicule et 32,1 \pm 3,2 s pour le sous-groupe DHA+/A β s.

Nous avons ensuite voulu préciser les effets protecteurs connus et attendus du DHA et du CNTF sur l'apprentissage des souris. La figure 73A regroupe les résultats précédents et illustre que le profil d'apprentissage des souris sous régime DHA+ exposées aux oligomères A β s est parfaitement superposable à celui des souris témoins sous régime Std, ce qui met bien en évidence l'effet neuroprotecteur du DHA. La figure 73B regroupe les résultats des souris sous régime Std exposées ou non aux oligomères A β s et/ou au CNTF. La figure 72 précédente avait déjà illustré que l'exposition aux oligomères A β s diminuait la pente d'apprentissage de 46 à 21%, pour atteindre un niveau à J4 non statistiquement différent de J1 ($p = 0,3777$), témoignant de capacités considérablement amoindries sous l'effet du stress amyloïde induit. Mais nous

avons aussi constaté que le traitement par le CNTF ne produisait aucun changement des profils, que ce soit chez les souris ayant subi l'injection préalable de la solution véhicule ou de la solution d'Aβs. Chez cette dernière, l'injection des oligomères Aβs a diminué la pente de la même façon qu'en l'absence de CNTF, avec une valeur à J4 diminuant de 45 à 23%, pour atteindre un niveau peu différent de celui à J1 ($p = 0,2298$). Ces résultats semblent démontrer que lorsqu'il est administré en une injection unique, le CNTF est totalement sans effet chez la souris de 18 mois sous régime Std, incapable de corriger ni même de minimiser le stress induit par l'exposition aux oligomères Aβs. Ces observations semblent s'opposer à celles qui nous ont conduits à rapporter les propriétés neuroprotectrices contre le stress amyloïde chez les souris jeunes (Garcia *et al.*, 2010), certes à partir de cellules implantées dans le ventricule latéral et produisant *in situ* le CNTF en continu.

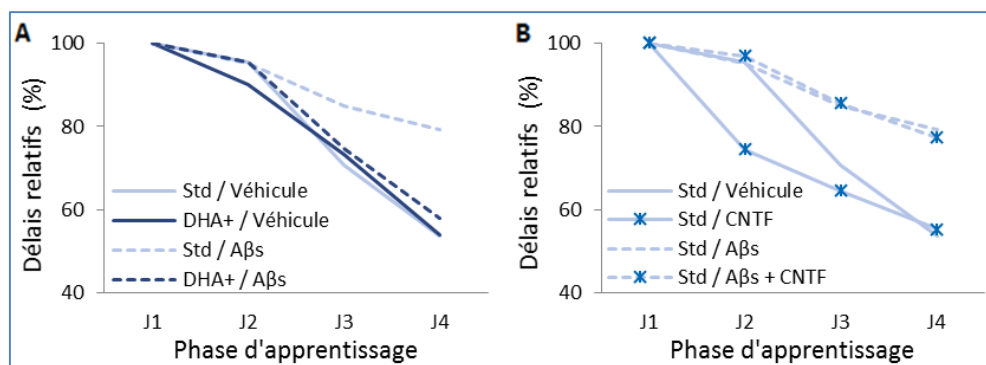


Figure 73 : Effets du régime supplémenté en DHA et du CNTF sur les capacités d'apprentissage des souris de 18 mois

(A) Effet du régime riche en DHA ; (B) Effet du CNTF. Les valeurs représentées sont les moyennes des délais mesurés de J1 à J4 pour chaque groupe ($N = 9$), exprimés proportionnellement au délai moyen mesuré à J1 pour les souris sous le même régime et ajusté à 100%. Valeurs mesurées à J1 : $26,4 \pm 3,2$ s pour le sous-groupe Std/véhicule, $30,2 \pm 3,2$ s pour le sous-groupe Std/Aβs, $28,6 \pm 3,0$ s pour le sous-groupe Std/CNTF, $27,8 \pm 3,3$ s pour le sous-groupe Std/Aβs/CNTF, $30,5 \pm 3,3$ s pour le sous-groupe DHA+/véhicule, $32,1 \pm 3,2$ s pour le sous-groupe DHA+/Aβs, $32,0 \pm 3,5$ s pour le sous-groupe DHA+/CNTF et $28,7 \pm 3,4$ s pour le sous-groupe DHA+/Aβs/CNTF.

Il nous fallait alors vérifier si les modifications membranaires survenues consécutivement à la supplémentation en DHA pouvaient avoir préservé ou restauré les capacités neuroprotectrices du CNTF chez les souris de 18 mois sous régime DHA+. La figure 74 présente les profils d'apprentissage des souris sous régime Std ou DHA+ soumises à l'injection d'oligomères Aβs et/ou de CNTF. Ces résultats confirment que le CNTF en une injection unique ne semble pas permettre d'améliorer les capacités d'apprentissage des souris de 18 mois. De même, l'association du DHA et du CNTF ne révèle aucun effet cumulé ou synergique sur les performances d'apprentissage des animaux. Toutefois, ces interprétations doivent être modérées par le fait que les effets protecteurs induits par le DHA seul sont suffisamment marqués et mène à des capacités si élevées qu'elles pourraient paraître difficiles à améliorer, notamment en raison de capacités de nage limitées des souris de 18 mois, le délai minimal requis étant de 15 s, soit une réduction maximale d'environ 50% du délai à J1.

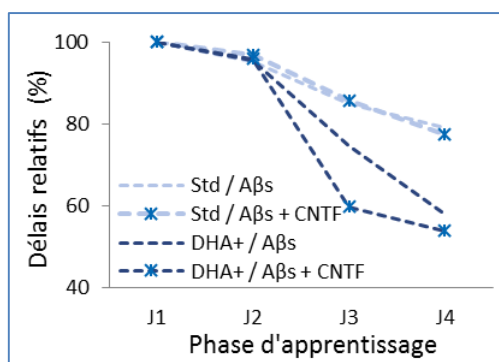


Figure 74 : Effets des régimes et du CNTF sur la susceptibilité au stress amyloïde lors de la phase d'apprentissage des souris de 18 mois exposées aux oligomères Aβs

Les valeurs représentées sont les moyennes des délais mesurés de J1 à J4 pour chaque groupe (N = 9), exprimés proportionnellement au délai moyen mesuré à J1 pour les souris sous le même régime et ajusté à 100%. Valeurs mesurées à J1 : 30,2 ± 3,2 s pour le sous-groupe Std/Aβs, 27,8 ± 3,3 s pour le sous-groupe Std/Aβs/CNTF, 32,1 ± 3,2 s pour le sous-groupe DHA+/Aβs et 28,7 ± 3,4 s pour le sous-groupe DHA+/Aβs/CNTF.

Au-delà des pentes d'apprentissage, ces résultats de temps de nage dans les différentes conditions de traitement testées ont été analysés en détail, ce qui nous a conduits notamment à calculer le cumul des délais réels requis par les souris exposées aux oligomères Aβs sur les 4 premiers jours de la phase d'apprentissage (Figure 75).

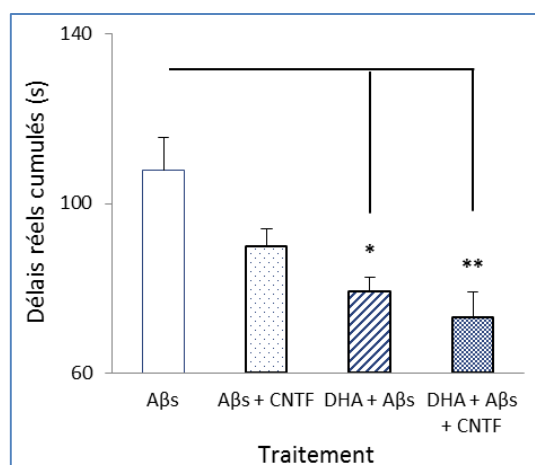


Figure 75 : Effets des régimes sur l'activité du CNTF et la susceptibilité au stress amyloïde lors de la phase d'apprentissage des souris de 18 mois exposées aux oligomères Aβs

Les valeurs représentées sont les moyennes ± SEM des délais cumulés par groupe (N = 9) sur les quatre premiers jours d'apprentissage (de J1 à J4). La significativité des différences calculées par rapport aux souris sous régime standard exposées aux oligomères Aβs et sans autre traitement est donnée comme suit *p<0,05 et **p<0,01.

Ces données montrent une amélioration faible et non significative ($p = 0,2764$) chez les souris sous régime Std grâce au traitement par le CNTF, réduisant le délai réel cumulé de $107,9 \pm 24,1$ s à $89,9 \pm 13,2$ s. Ceci corrobore les interprétations précédentes qui suggéraient la perte de la fonctionnalité cérébrale du CNTF chez les souris âgées sous régime Std. En revanche, chez les souris âgées sous régime DHA+, les délais réels cumulés étaient significativement réduits ($p = 0,0243$) à $79,2 \pm 10,9$ s par rapport aux souris âgées sous régime Std et exposées aux oligomères qui ont servi de référence dans cette analyse. Cette baisse dans les souris sous régime DHA+ s'est encore renforcée en conséquence du traitement par le CNTF pour atteindre

un cumul de $73,0 \pm 19,2$ s dont la différence avec les souris de référence était d'une significativité supérieure ($p = 0,0045$). Cette analyse, basée sur le cumul des délais réels, tient compte des jours intermédiaires et semble donc plus informative que les comparaisons entre les délais à J1 et J4. De possibles effets cumulatifs pourraient ainsi suggérer que le régime DHA+ semble favoriser l'action neuroprotectrice du CNTF, même si cette dernière reste apparemment très modeste dans les conditions expérimentales testées.

c. Analyses de la mémoire à long-terme

Le scénario adopté dans cette étude prévoyait de finir l'exploration cognitive des souris par l'analyse de la mémoire à long terme réalisée par la restitution de la tâche imposée 3 j après la fin de la phase d'apprentissage, soit 14 j après les injections icv. Lors du test de restitution (1 min), les capacités de mémoire sont d'autant plus élevées que la souris insiste en explorant majoritairement le quadrant correspondant et en croisant souvent l'emplacement de la plateforme. Les résultats obtenus indiquent que les souris ont passé entre 25 et 29% du temps imparti dans le quadrant incluant l'emplacement de la plateforme, soit une proportion très proche de l'exploration aléatoire, ceci quel que soit le régime ou le traitement appliqué (Figure 76).

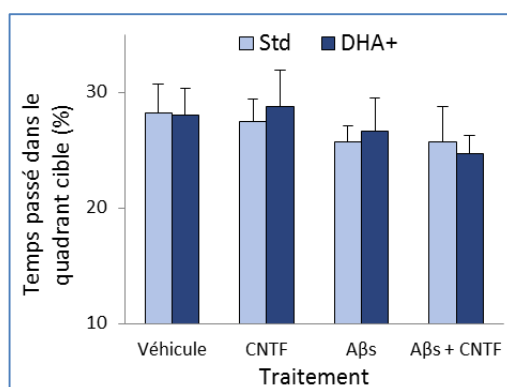


Figure 76 : Effets du régime supplémenté en DHA et du CNTF sur la mémoire à long terme des souris âgées de 18 mois

Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM par groupe ($n = 9$).

Cette dernière série de résultats suggère en première lecture que les souris âgées de 18 mois aient perdu toute capacité de mémoire à long terme. D'ailleurs, dans ces conditions très péjoratives, l'exposition aux oligomères, certes éloignée de 14 j dans le temps, n'a même pas pu altérer davantage les résultats. Les molécules présumées pouvoir conférer une certaine protection vis-à-vis du stress amyloïde se sont révélées tout aussi inefficaces pour améliorer les performances. Dans cette première étude approfondie de la souris âgée, nous avons choisi de suivre les protocoles validés sur la souris jeune, mais ces observations démontrent bien la limite de l'amalgame : la souris âgée est bien un modèle différent de la souris jeune, en particulier concernant les capacités cérébrales de répondre aux traitements. Il apparaît clairement aussi que les caractéristiques de la souris âgée ne peuvent se résumer à la simple transposition des propriétés et

des capacités de la souris jeune avec juste quelques mois d'âge en plus. Cette conclusion paraît presque un lieu commun, d'une grande banalité, mais en la négligeant, en la considérant insuffisamment ou en persistant dans la méconnaissance des processus expliquant ces « évidences », de nouveaux échecs sont à craindre dans de nombreuses études animales et cliniques comme les plus récentes destinées à évaluer l'efficacité thérapeutique de plusieurs stratégies anti-MA potentielles. La démonstration de ces différences faisait clairement partie des objectifs de ce travail et témoigne de la nécessité de mieux comprendre sur quels mécanismes elles reposent. Comme nous en faisons l'hypothèse, il est indispensable que les modèles de souris âgée soient mieux caractérisés et que les protocoles qui leur sont appliqués soient adaptés et optimisés en conséquence, notamment en termes de dose d'oligomères injectée, de durée pertinente des examens post-opératoires, de nature des tests cognitifs et de timing de la supplémentation, etc.

Le potentiel neuroprotecteur du DHA dans le cadre de la MA a déjà été décrit en introduction. Certaines de ses propriétés *in vitro* ont été mises en évidence et élucidées dans notre laboratoire sur le modèle de neurones primaires exposés aux oligomères d'Aβs (Florent-Bécharde *et al.*, 2007). L'effet du DHA contre le déclin cognitif après injection intracérébrale unique d'oligomères Aβs a déjà été démontré dans un modèle *in vivo* au laboratoire (Allouche *et al.*, soumis). D'autres expérimentations *in vivo* ont mis en évidence une amélioration de l'apprentissage après supplémentation nutritionnelle par des huiles de poissons ou certains AGPI dont le DHA, confirmant l'influence déterminante de ces derniers (Plourde and Cunnane, 2007 ; Yurko-Mauro *et al.*, 2010). Plusieurs mécanismes ont été avancés pour expliquer ces effets (Oster and Pillot, 2010), parmi lesquels la régulation de l'expression de gènes et de cascade de signalisation impliquées dans la survie neuronale, la modulation des processus neuroinflammatoires et pro-oxydants, la production de métabolites neuroprotecteurs comme la neuroprotectine D1, ou le maintien de l'architecture et de la fluidité des membranes neuronales (Bazan *et al.*, 2011). Bien que les essais cliniques traitant des patients atteints de MA par supplémentation en AGPI *n*-3 (dont le DHA) se soient soldés par des résultats négatifs ou contradictoires, les conclusions ont également suggéré que cette supplémentation procure des effets bénéfiques dépendants de divers paramètres tels que le stade de la maladie, la nature du régime lipidique ou le statut en apolipoprotéine E (Barberger-Gateau *et al.*, 2007 ; Jicha and Markesbery, 2010). Toutes ces données conduisent surtout à indiquer que le DHA pourrait davantage jouer un rôle préventif que curatif. Le DHA, les huiles de poissons ou des aliments gras d'origine marine pourraient donc être à la base d'approches nutritionnelles permettant de prévenir ou de retarder la survenue de syndromes liés au vieillissement dont la MA.

Concernant le CNTF, son potentiel neuroprotecteur a été décrit dans plusieurs études dans le cadre de lésions et de troubles cérébraux. En effet, dans un modèle de rat atteint de sclérose en plaques, le CNTF exerce ce rôle dans la moelle épinière et le cortex cérébral en limitant l'infiltration de cellules inflammatoires (lymphocytes T, leucocytes et macrophages), ainsi qu'en activant les cytokines anti-inflammatoires et en réduisant les cytokines pro-inflammatoires et la prolifération astrocytaire. Il stoppe également la démyélinisation, la perte axonale et diminue la mort neuronale (Fang *et al.*, 2013). Dans un

modèle de neuroblastome différencié en culture, le CNTF favorise la survie cellulaire et la croissance des neurites en induisant les voies de signalisation de STAT₃, ERK_{1/2} et AKT (Wang *et al.*, 2014). L'activation par le CNTF de la voie de STAT₃ dans les cellules ganglionnaires de la rétine est également une condition nécessaire à la régénération du nerf optique, favorisée par une stimulation inflammatoire qui permet la survie de ces neurones et la croissance axonale (Leibinger *et al.*, 2013). Enfin, dans le cadre de la MA, les propriétés neuroprotectrices du CNTF contre le stress amyloïde ont été étudiées dans notre laboratoire, montrant que l'apport chronique de CNTF empêche le déclin cognitif et améliore la mémoire à court et long terme ainsi que les capacités d'apprentissage de souris jeunes modèles de MA exposées de façon chronique ou aiguë aux oligomères Aβs (Garcia *et al.*, 2010). *In vitro*, le CNTF prévient la diminution de l'expression de protéines synaptiques (PSD-95 et GluR1) de neurones en cultures, préserve la fonctionnalité des voies de signalisation cellulaire (CREB, AKT et STAT₃) et empêche l'atteinte du cytosquelette (Garcia *et al.*, 2010).

L'ensemble de nos résultats évaluant les capacités mnésiques et cognitives des animaux suggère que les deux composés neuroprotecteurs testés, le DHA et le CNTF, puissent exercer des effets bénéfiques cumulatifs grâce à des mécanismes distincts, complémentaires et synergiques, comme notamment le remodelage membranaire, l'amélioration des niveaux relatifs des protéines synaptiques et la préservation d'un environnement fonctionnel du récepteur du CNTF démontrés précédemment. Ceci pourrait contribuer à préserver, voire à favoriser, les capacités de mémoire à court terme et les capacités d'apprentissage, et même à limiter le stress amyloïde et ses conséquences neurotoxiques. Cependant, ces effets bénéfiques ne se sont pas manifestés lors de l'étude de la mémoire à long terme, de toute évidence en raison d'un niveau cognitif particulièrement altéré lié sans doute au vieillissement lui-même. L'impact plus important de l'exposition aux oligomères Aβs doit aussi être rappelé là pour expliquer ces résultats, se traduisant par une altération significativement plus marquée des performances de mémoire à court terme dans le labyrinthe en Y chez les souris de 18 mois sous régime Std que chez les souris jeunes. D'autres études publiées menées dans notre laboratoire (Youssef *et al.*, 2008 ; Garcia *et al.*, 2010 ; Desbène *et al.*, 2012) avaient en effet conduit à des observations différentes, obtenues sur ce même modèle animal de neurotoxicité mais elles ont été utilisées au stade de jeune adulte, à 3 mois d'âge. Des études complémentaires évaluant l'intérêt d'une supplémentation en DHA plus précoce, plus longue ou chronique, doivent être envisagées pour poursuivre l'exploration des capacités protectrices des composés testés et évaluer plus précisément les capacités réelles du DHA à corriger les désordres membranaires liés au vieillissement. Il n'est pas inintéressant de confronter nos résultats sur les modèles animaux à ceux de plusieurs études cliniques faisant état d'observations contradictoires qui entretiennent un doute quant au réel bénéfice à attendre d'une supplémentation d'AGPI *n*-3 contre le vieillissement cérébral et la MA (Barberger-Gateau *et al.*, 2006 ; Dangour *et al.*, 2010 ; Quinn *et al.*, 2010 ; Yurko-Mauro *et al.*, 2010b). Néanmoins, il importe au préalable d'essayer de comprendre les raisons qui peuvent expliquer l'échec apparent du DHA, et du CNTF, à préserver la mémoire à long terme chez les souris âgées. Diverses hypothèses peuvent être avancées et devront être évaluées. Nous devons explorer l'influence possible du statut neuroinflammatoire du cerveau

âgé, ce qui n'a pas été abordé dans cette étude. Mais nous pensons en priorité à questionner l'éventuelle inadéquation du test de la nage forcée pour les souris âgées, nettement plus grosses et plus lourdes que les souris jeunes. Utilisé pour évaluer la mémoire à long terme, il a fourni des résultats quasi ininterprétables et en tout cas incohérents quant aux effets neuroprotecteurs du régime DHA+ pourtant clairement mis en évidence grâce aux tests en labyrinthe ou aux analyses biochimiques et fonctionnelles sur les protéines membranaires. C'est donc l'adaptation des protocoles d'évaluation qui devra être envisagée pour poursuivre ces études sur la souris âgée.

C. Conclusions

Les recommandations d'ordre diététique mises en place depuis plusieurs années par les programmes nationaux de nutrition et santé ont largement démontré leur efficacité dans la prévention des maladies cardiovasculaires et métaboliques. En revanche, concernant les maladies neurodégénératives comme la MA, aucune mesure claire n'a encore été réellement adoptée, en dépit de l'abondance des données scientifiques et des indications pouvant être suggérées dans ce sens.

La présente étude a été programmée dans la continuité logique des différents résultats obtenus au laboratoire afin d'évaluer *in vivo* l'intérêt neuroprotecteur de combiner l'apport nutritionnel de DHA et un traitement par le CNTF contre le vieillissement cérébral et la MA. Nos résultats ont confirmé que le DHA d'origine alimentaire préservait l'intégrité synaptique et la fonctionnalité cérébrale du CNTF et de son récepteur chez la souris âgée, en améliorant même la signalisation et réponse neuroprotectrice. Nous avons associé ces propriétés au fait que l'incorporation membranaire du DHA contribuait à remodeler la bicouche et à favoriser la formation du complexe CNTF-R dans les rafts, ce qui pouvait influencer et restaurer les capacités neurotrophiques du CNTF et de son récepteur diminuées par le vieillissement ou les dyslipidémies.

Les résultats obtenus lors des expérimentations décrites dans cette seconde partie confirment que la supplémentation alimentaire en DHA peut d'une part, limiter les dyslipidémies et les effets délétères du vieillissement sur le métabolisme lipidique, et d'autre part, contribuer à lutter contre l'altération des performances cognitives en préservant les fonctionnalités cérébrales. Les effets bénéfiques du DHA sur la cognition pourraient reposer sur l'accroissement de la réserve cognitive et favoriser la plasticité synaptique, comme le suggère l'augmentation des taux de protéines synaptiques observée dans la fraction membranaire extraite à partir de l'hippocampe des souris. Ces effets pourraient également provenir de l'enrichissement des membranes neuronales en DHA et découler d'un maintien ou d'une modulation de la répartition et de l'architecture des microdomaines membranaires. Les fonctions cognitives ainsi favorisées dépendraient des taux cérébraux d'AGPI *n-3*, eux-mêmes pouvant être directement modulés par un apport nutritionnel approprié. Des teneurs membranaires optimales en DHA seraient alors nécessaires pour minimiser la susceptibilité à la MA et aux maladies neurodégénératives en général.

Les résultats de notre étude permettent de valider l'utilisation d'approches nutritionnelles préventives, basées sur un apport en DHA, capables de préserver les capacités du CNTF, et possiblement celles d'autres voies neuroprotectrices, lors du vieillissement. Ils conduisent aussi à l'idée qu'un apport optimisé en DHA soit envisageable en tant que traitement adjuvant associé aux protocoles thérapeutiques utilisant d'autres molécules neuroprotectrices. L'objectif affirmé de cette association serait de préserver ou de restaurer les propriétés des membranes cérébrales, sièges de nombreuses fonctions cellulaires et de cibles potentielles capables de protéger le cerveau des altérations liées au vieillissement.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

Dans les laboratoires de recherche publics comme dans ceux de l'industrie pharmaceutique, la recherche thérapeutique est très active dans le périmètre de la MA. Plus d'une centaine de molécules thérapeutiques seraient en phase d'essais, certaines visant à stopper l'accumulation des peptides amyloïdes, d'autres tentant de bloquer la phosphorylation anormale des protéines Tau. Des chercheurs travaillent aussi activement sur la mise au point d'approches d'immunothérapie dans le but d'activer les défenses immunitaires des malades pour inactiver et détruire les peptides et les plaques amyloïdes. Mais pour parvenir à traiter la MA, il est indispensable de comprendre les mécanismes qui déclenchent l'apparition des troubles et favorisent leur progression, ce qui reste encore largement à élucider.

Pour atteindre cet objectif, de nombreuses stratégies s'appuient sur les mécanismes physiologiques déployés par le cerveau pour lutter contre la maladie. Pourtant, depuis sa découverte il y a plus d'un siècle, aucun traitement curatif ne permet encore de guérir de la MA, d'agir sur les mécanismes cellulaires mis en jeu ou d'empêcher efficacement la perte synaptique ou la dégénérescence et la mort neuronale. Seuls certains traitements médicamenteux permettent de ralentir transitoirement sa progression symptomatique. Les médicaments potentiels que les sociétés pharmaceutiques développent ont tous satisfait au crible de l'efficacité sur des modèles précliniques de la MA, mais pour l'instant tous échouent lors des essais cliniques en phase II, incapables de prouver leur efficacité pour le traitement de patients atteints de la MA. Les raisons de ces échecs récurrents sont certainement diverses, mais l'une d'elles semble pourtant très simple, l'inadéquation des modèles précliniques. D'ailleurs, lors du récent congrès de l'association internationale ADPD (*Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease*) à Barcelone, un conférencier renommé ne concluait-il pas sa présentation sur les difficultés de transposer les résultats de l'animal modèle au patient par le constat très désabusé que « Décidemment, les malades Alzheimer sont de bien mauvaises souris ! ».

Faut-il réellement rappeler que la MA est une pathologie plurifactorielle du sujet âgé ? A-t-on pris la pleine mesure de l'influence du vieillissement, ce processus évolutif résultat d'altérations qui s'accumulent sous l'influence de l'exposition chronique et prolongée à des facteurs de risque environnementaux et que la recherche biomédicale semble souvent négliger pour recourir aux modèles génétiquement modifiés que les biotechnologies n'ont pas tardé à ériger comme les modèles ultimes ? Vieillir n'est certes pas une maladie en soi, mais un processus naturel et inéluctable dont la cinétique de progression repose sur de multiples variables dont plusieurs peuvent être modifiées. Le vieillissement qui en résulte rend les personnes âgées plus vulnérables au développement de pluri-pathologies et devient alors une cause majeure de maladies et de décès. Vieillir paraît d'ailleurs le facteur aggravant par excellence de la MA. La population vieillissante est très hétérogène et rien n'est plus éloigné d'un sujet qui a réussi son

vieillessement qu'un vieillard fragile présentant plusieurs pathologies. En conséquence, la non-prise en compte de ce paramètre primordial qu'est le vieillissement, de ses effets sur le cerveau et l'organisme en général, et des changements métaboliques et fonctionnels qu'il impose bouleverse les fondamentaux de la lutte contre les maladies liées au vieillissement, et celle contre la MA plus particulièrement. Les résultats de ce travail de thèse ont tenté de démontrer l'importance de définir biologiquement certaines conséquences du vieillissement en se focalisant sur le tissu cérébral et ses propriétés fonctionnelles. Nous avons non seulement démontré que la souris jeune se distingue de la souris âgée tant sur les aspects biochimiques que neurobiologiques et comportementaux, mais nous avons aussi souligné l'importance de questionner la pertinence des modes d'expérimentation animale utilisés en préclinique, des paradigmes aux tests et aux protocoles, et leur adaptation aux modèles d'étude du vieillissement.

L'établissement de souris modèles de MA est un domaine de recherche très prolifique, que ce soit sur la base d'injections intracérébrales, unique ou répétées, ou de modifications génétiques, simples ou multiples. Le but évident est là de générer des souris de plus en plus humanisées, reproduisant les caractéristiques cliniques jugées prioritaires de la MA allant des lésions cérébrales aux troubles cognitifs, afin de mieux comprendre l'étiologie de la maladie ou d'évaluer de nouvelles approches thérapeutiques. Du fait de la complexité de la MA, de nombreux modèles existent, notamment des souris multiples transgéniques. Mais si les altérations observées chez ces souris semblent effectivement globalement assimilables à celles que développent les patients Alzheimer, aucune des mutations génétiques introduites pour concevoir l'animal modèle ne peut évidemment modéliser la diversité des effets cumulatifs induits par l'exposition chronique aux facteurs de risque environnementaux de la maladie humaine, et notamment les dégradations liées au vieillissement. Dans la mesure où ces modèles doivent servir au développement de nouvelles molécules thérapeutiques anti-MA devant prouver leur efficacité sur des patients âgés, les différents aspects du vieillissement cérébral nous paraissent devoir être davantage pris en compte dans les futurs modèles animaux.

De nombreuses équipes consacrent leurs efforts à concevoir des médicaments contre le vieillissement, permettant de ralentir son processus et prolonger la vie jusqu'à 120 ans et plus peut-être. Mais quand la médecine augmente la quantité de vie, qu'en est-il de sa qualité quand les chiffres de l'INSEE suggère la présence de maladies au moins partiellement invalidantes durant les 20 à 25 dernières années de la vie ? Nos sociétés occidentales font la promotion d'un modèle de jeunesse, de santé, de consommation et de séduction qui va souvent de pair avec l'exclusion des personnes âgées, plus ou moins dépendantes. L'allongement de la durée de vie deviendrait-elle alors une menace pour notre société ? Si la longévité continue d'augmenter sans comprendre réellement les mécanismes impliqués dans le vieillissement et les maladies chroniques qui lui sont associées, où s'arrêtera l'exclusion des personnes âgées rendues dépendantes par ces pathologies ?

Lorsque nous avons défini les orientations de cette thèse, il nous a paru primordial de chercher à identifier des cibles touchées par le vieillissement et, sur la base des travaux antérieurs du laboratoire, de penser à des stratégies susceptibles de les préserver ou de les restaurer. Nos résultats ont permis d'identifier le compartiment membranaire des cellules comme un élément clé déstabilisé par le vieillissement. Ces vingt dernières années, un grand nombre d'articles ont témoigné que l'importance de la membrane était de plus en plus prise en compte, conduisant notamment à identifier les microdomaines comme les rafts, à isoler et caractériser les protéines associées et leur implication dans un nombre important d'évènements biologiques dont la transduction du signal, l'endocytose ou l'infection par des pathogènes. Nos résultats apportent des preuves supplémentaires que l'intégrité, la composition et l'architecture des rafts sont nécessaires au fonctionnement optimal du cerveau.

Les recherches sur la MA ont déjà identifié comme une étape déterminante celle de l'interaction des oligomères solubles de peptide A β avec la membrane plasmique des neurones, capable d'initier en cascades divers mécanismes neurotoxiques, dont l'activation de voies pro-inflammatoire et pro-apoptotique, la production de stress oxydant et l'altération du cytosquelette, conduisant à la mort neuronale. Les études sur les rafts ont également permis de comprendre que leur composition en lipides et en protéines associées conditionne au moins en partie leur structure et leur capacité fonctionnelle de constituer le support de plateforme indispensable à plusieurs voies de transduction et de signalisation. Nos résultats montrent que le vieillissement « physiologique », bien avant le développement d'une quelconque pathologie, module la composition et la structure des rafts, provoquant une augmentation de la vulnérabilité neuronale. En conséquence, il nous paraît évident d'imaginer l'impact délétère du vieillissement membranaire sur l'efficacité thérapeutique de cibles normalement ancrées dans la bicouche, mais dont la distribution modifiée dans les microdomaines ne permet plus alors de garantir l'environnement optimal nécessaire à l'effet biologique attendu en réponse à des molécules thérapeutiques destinées à traiter les maladies liées au vieillissement. Nos résultats en ont d'ailleurs fait la preuve avec la voie neuroprotectrice du CNTF, choisie dans notre étude pour son potentiel anti-Alzheimer. Or, ce qui a été constaté pour cette voie doit certainement pouvoir être considéré aussi pour les autres protéines de la membrane neuronale comme les canaux et les récepteurs des neurotransmetteurs essentiels au fonctionnement cérébral.

Dans la perspective de poursuivre nos travaux et d'en préciser davantage les conséquences à en tirer, il serait intéressant d'engager une étude protéomique des microdomaines et d'appréhender les effets des remodelages membranaires sur divers récepteurs comme ceux des neurotransmetteurs et sur les fonctionnalités du cerveau âgé. Les observations discutées dans cette thèse ne sauraient d'ailleurs se limiter aux seuls rafts des membranes cérébrales et doivent pouvoir s'étendre aux autres membranes biologiques

dont l'étude des microdomaines permettrait peut-être de mieux comprendre la sensibilité au vieillissement d'autres pathologies. Le diabète de type 2 pourrait être de celles-ci, puisque le récepteur de l'insuline peut être endocyté dans les rafts et que la signalisation associée semble dépendre de leur intégrité. Les rafts sont également le support de l'initiation de la signalisation, notamment pour le système immunitaire dont certaines pathologies associées aux lymphocytes atteignent particulièrement les seniors comme certains lymphomes ou les leucémies lymphoïdes chroniques. Le vieillissement membranaire pourrait là aussi être une piste de recherche intéressante à développer.

Toutes les études épidémiologiques suggèrent que le vieillissement joue une part majeure dans le risque de développer une MA, mais il est également essentiel d'identifier les facteurs l'accéléralant ou l'aggravant. Nous l'avons déjà longuement décrit, notamment en introduction de cette thèse, le vieillissement n'est pas simplement l'accumulation d'années qui passent, mais repose sur un processus complexe soumis à l'influence de divers facteurs environnementaux. Nos résultats ont permis de démontrer qu'une dyslipidémie induite par un régime alimentaire surchargé en lipides saturés agit véritablement comme un facteur pro-vieillessement aux niveaux métabolique et cérébral. L'ensemble de nos résultats mène à considérer qu'un régime hyperlipidique administré à une souris jeune conduit à des altérations des membranes cérébrales comparables à celles observées chez une souris âgée. Les troubles du métabolisme lipidique sont connus de longue date comme des facteurs aggravants du risque cardiovasculaire, mais aussi du risque neurodégénératif identifié plus récemment et en faveur duquel notre étude apporte un argument supplémentaire du lien avec un apport alimentaire excessif en lipides. Dans le but de généraliser nos observations, ce travail pourrait être poursuivi en évaluant l'impact sur la membrane cérébrale d'autres facteurs de risques connus dans le développement de la MA. Ainsi, il est très vraisemblable que l'apolipoprotéine E de type E4, dont le génotype correspondant est identifié parmi les quelques facteurs de risque génétiques reconnus à ce jour, puisse influencer sur l'organisation structurale et la composition des rafts des membranes cérébrales, notamment par une dérégulation de la distribution tissulaire des lipides et en particulier du cholestérol que nous avons identifié comme un lipide clé dans notre étude. Une étude analogue des membranes neuronales devrait être également d'un grand intérêt sur des modèles d'obésité telles que les souris *ob/ob* ou le modèle de souris dyslipidémique LSR+/- développé au laboratoire.

En complément des traitements médicamenteux dont on connaît la limite actuelle, des approches non médicamenteuses sont habituellement préconisées pour les patients atteints de MA, consistant globalement à adapter l'environnement de la personne malade et à développer une approche psychosociale spécifique. Ces stratégies font aujourd'hui partie intégrante de la prise en charge thérapeutique de la personne atteinte de la MA et visent prioritairement à préserver le plus longtemps possible ses capacités résiduelles pour tenter ainsi d'améliorer sa qualité de vie. Même si la conjonction de tous ces efforts parvient à ralentir la progression de la maladie et de retarder l'inéluctable, il paraît évident

qu'actuellement le meilleur moyen de soigner une MA reste encore de ne pas la développer. Dans cette optique, nos résultats nous ont permis de souligner l'intérêt potentiel d'une stratégie interventionnelle préventive basée sur l'alimentation en tant que facteur anti-vieillessement. Nos résultats sur le DHA alimenteront sans doute un corpus de démonstrations scientifiques déjà très pourvu sur les propriétés neuroprotectrices de l'acide gras, mais ils identifient surtout un mécanisme d'action peu documenté jusqu'alors consistant à protéger les membranes cérébrales – et sans doute celles d'autres tissus – pour restaurer ou à défaut ralentir les altérations induites lors du vieillissement. Bien que les effets réels des AGPI *n-3* fassent encore l'objet de débats contradictoires, nos résultats démontrent une action bénéfique du DHA sur le métabolisme, sur la fonctionnalité cérébrale et sur la mémoire chez la souris âgée, identifiant clairement la membrane comme cible. Notre étude va encore plus loin et fait la preuve qu'un apport alimentaire en DHA est capable de maintenir une capacité de réponse efficace et appropriée aux thérapeutiques au cours du vieillissement, notamment dans des conditions de stress amyloïde comme dans le cas de la MA, en potentialisant l'effet de molécules neuroprotectrices dont l'efficacité est altérée par le vieillissement membranaire. Sachant que les AGPI-LC *n-3* sont potentiellement inter-convertibles et que les effets bénéfiques de l'ALA et de l'EPA ont été rapportés par plusieurs études sur le risque cardiovasculaire et la dégénérescence maculaire de la rétine (DMLA), il est concevable de penser que le DHA ne serait pas le seul à procurer cet effet bénéfique contre le vieillissement membranaire ou les pathologies associées, mais que nous pourrions raisonnablement élargir ces aspects protecteurs aux AGPI *n-3* dans leur globalité. Des études complémentaires envisageant des formulations différentes pourraient aussi apporter des informations très utiles sur ce point.

Notre étude nous a aussi permis d'observer non seulement une augmentation du cholestérol membranaire lors du vieillissement, mais aussi la correction de ce taux chez les souris âgées ayant bénéficié de la supplémentation en DHA. Le taux de cholestérol plasmatique ou cérébral est un facteur de risque connu de la MA et notre étude a confirmé et souligné l'importance de son rôle dans les membranes cérébrales lors du vieillissement. Son niveau et sa régulation membranaire pourrait être un aspect à approfondir notamment en dosant ses métabolites, comme le 24-S-hydroxycholestérol, afin d'évaluer son taux d'élimination et son activité au sein de la membrane. Enfin, dans le but d'étendre nos observations, il serait intéressant d'examiner l'effet des AGPI *n-3* dans d'autres types de pathologies associées au vieillissement et d'étudier le maintien des capacités de réponse sur d'autres molécules au potentiel thérapeutique.

Finalement, notre travail ouvre de nombreuses perspectives à la fois pour comprendre les mécanismes et l'impact du vieillissement, mais aussi pour proposer par l'alimentation des approches synergiques et complémentaires dans la perspective de ralentir le développement des maladies liées au vieillissement et de favoriser le bien-vieillir.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- de Abreu, D., Guessous, I., Gaspoz, J.-M., and Marques-Vidal, P. (2014). Compliance with the Swiss Society for Nutrition's dietary recommendations in the population of Geneva, Switzerland: a 10-year trend study (1999-2009). *J. Acad. Nutr. Diet.* *114*, 774–780.
- Addis, D. R., Leclerc, C. M., Muscatell, K. A., and Kensinger, E. A. (2010). There are age-related changes in neural connectivity during the encoding of positive, but not negative, information. *Cortex J. Devoted Study Nerv. Syst. Behav.* *46*, 425–433.
- Aebischer, P. *et al.* (1996). Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat. Med.* *2*, 696–699.
- Agence régionale de santé (2012). *Maladie d'Alzheimer.*
- Ahmad, A., Murthy, M., Greiner, R. S., Moriguchi, T., and Salem, N. (2002). A decrease in cell size accompanies a loss of docosahexaenoate in the rat hippocampus. *Nutr. Neurosci.* *5*, 103–113.
- Ahmed, S. N., Brown, D. A., and London, E. (1997). On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry (Mosc.)* *36*, 10944–10953.
- Aïd, S., Vancassel, S., Poumès-Ballihaut, C., Chalon, S., Guesnet, P., and Lavielle, M. (2003). Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. *J. Lipid Res.* *44*, 1545–1551.
- Akbar, M., and Kim, H.-Y. (2002). Protective effects of docosahexaenoic acid in staurosporine-induced apoptosis: involvement of phosphatidylinositol-3 kinase pathway. *J. Neurochem.* *82*, 655–665.
- Allen, S. J., and Dawbarn, D. (2006). Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979* *110*, 175–191.
- Alliot, J., Boghossian, S., Jourdan, D., Veyrat-Durebex, C., Pickering, G., Meyniel-Denis, D., and Gaumet, N. (2002). The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *57*, B312–B320.
- Allmann, D. W., and Gibson, D. M. (1965). FATTY ACID SYNTHESIS DURING EARLY LINOLEIC ACID DEFICIENCY IN THE MOUSE. *J. Lipid Res.* *6*, 51–62.
- Alzheimer's Association (2013). 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* *9*, 208–245.
- Andrews-Hanna, J. R., Snyder, A. Z., Vincent, J. L., Lustig, C., Head, D., Raichle, M. E., and Buckner, R. L. (2007). Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. *Neuron* *56*, 924–935.
- ANSES (2013a). Les acides gras trans.
- ANSES (2013b). Les études individuelles nationales des consommations alimentaires (INCA).
- ANSES (2013c). Les lipides.
- Arancio, O., and Chao, M. V. (2007). Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 325–330.
- Arapulisy, O., Mannangatti, P., and Jayanthi, L. D. (2013). Regulated norepinephrine transporter interaction with the neurokinin-1 receptor establishes transporter subcellular localization. *J. Biol. Chem.* *288*, 28599–28610.
- Arendt, T. (2009). Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *118*, 167–179.
- 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.
- Assaife-Lopes, N., Sousa, V. C., Pereira, D. B., Ribeiro, J. A., and Sebastião, A. M. (2014). Regulation of TrkB receptor translocation to lipid rafts by adenosine A(2A) receptors and its functional implications for BDNF-induced regulation of synaptic plasticity. *Purinergic Signal.* *10*, 251–267.
- Astarita, G., and Piomelli, D. (2011). Towards a whole-body systems [multi-organ] lipidomics in Alzheimer's disease. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *85*, 197–203.
- 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.
- Bach, S. A., de Siqueira, L. V., Müller, A. P., Oses, J. P., Quatrim, A., Emanuelli, T., Vinadé, L., Souza, D. O., and Moreira, J. D. (2014). Dietary omega-3 deficiency reduces BDNF content and activation NMDA receptor and Fyn in dorsal hippocampus: implications on persistence of long-term memory in rats. *Nutr. Neurosci.* *17*, 186–192.
- Bacia, K., Schwille, P., and Kurzchalia, T. (2005). Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 3272–3277.
- Bailey, J. A., and Lahiri, D. K. (2006). Neuronal differentiation is accompanied by increased levels of SNAP-25 protein in fetal rat primary cortical neurons: implications in neuronal plasticity and Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1086*, 54–65.

- Balakrishnan, K., Verdile, G., Mehta, P. D., Beilby, J., Nolan, D., Galvão, D. A., Newton, R., Gandy, S. E., and Martins, R. N. (2005). Plasma Abeta42 correlates positively with increased body fat in healthy individuals. *J. Alzheimers Dis. JAD* 8, 269–282.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., and Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *Lancet* 377, 1019–1031.
- Balogun, K. A., and Cheema, S. K. (2014). The expression of neurotrophins is differentially regulated by omega-3 polyunsaturated fatty acids at weaning and postweaning in C57BL/6 mice cerebral cortex. *Neurochem. Int.* 66, 33–42.
- Barberger-Gateau, P., Delcourt, C., and Berr, C. (2006). Peroxydation lipidique et vieillissement cérébral : l'apport des études épidémiologiques. *Ol. Corps Gras Lipides* 13, 54–58.
- Barberger-Gateau, P., Raffaitin, C., Letenneur, L., Berr, C., Tzourio, C., Dartigues, J. F., and Alpérovitch, A. (2007). Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study. *Neurology* 69, 1921–1930.
- Barker, A., Jones, R., and Jennison, C. (1995). A prevalence study of age-associated memory impairment. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* 167, 642–648.
- Barre, D. E. (2007). The role of consumption of alpha-linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in human metabolic syndrome and type 2 diabetes—a mini-review. *J. Oleo Sci.* 56, 319–325.
- Bartke, A. *et al.* (1999). Effects of growth hormone overexpression and growth hormone resistance on neuroendocrine and reproductive functions in transgenic and knock-out mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 222, 113–123.
- Bartke, A., Wright, J. C., Mattison, J. A., Ingram, D. K., Miller, R. A., and Roth, G. S. (2001). Extending the lifespan of long-lived mice. *Nature* 414, 412.
- Bartrés-Faz, D., and Arenaza-Urquijo, E. M. (2011). Structural and functional imaging correlates of cognitive and brain reserve hypotheses in healthy and pathological aging. *Brain Topogr.* 24, 340–357.
- Basselín, M., Ramadan, E., and Rapoport, S. I. (2012). Imaging brain signal transduction and metabolism via arachidonic and docosahexaenoic acid in animals and humans. *Brain Res. Bull.* 87, 154–171.
- Basu, R., Man, C. D., Campioni, M., Basu, A., Klee, G., Toffolo, G., Cobelli, C., and Rizza, R. A. (2006). Effects of Age and Sex on Postprandial Glucose Metabolism Differences in Glucose Turnover, Insulin Secretion, Insulin Action, and Hepatic Insulin Extraction. *Diabetes* 55, 2001–2014.
- Bauer, S. (2009). Cytokine control of adult neural stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1153, 48–56.
- Bazan, N. G., Molina, M. F., and Gordon, W. C. (2011). Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Nutr.* 31, 321–351.
- Beaufrère, B., and Morio, B. (2000). Fat and protein redistribution with aging: metabolic considerations. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54 Suppl 3, S48–S53.
- Beck, A. M., and Ovesen, L. (1998). At which body mass index and degree of weight loss should hospitalized elderly patients be considered at nutritional risk? *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 17, 195–198.
- Beck, A. M., and Ovesen, L. (2002). Body mass index, weight loss and energy intake of old Danish nursing home residents and home-care clients. *Scand. J. Caring Sci.* 16, 86–90.
- Beck, B., and Pourié, G. (2013). Ghrelin, neuropeptide Y, and other feeding-regulatory peptides active in the hippocampus: role in learning and memory. *Nutr. Rev.* 71, 541–561.
- Beilharz, J. E., Maniam, J., and Morris, M. J. (2014). Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. *Brain. Behav. Immun.* 37, 134–141.
- Bellush, L. L., Wright, A. M., Walker, J. P., Kopchick, J., and Colvin, R. A. (1996). Caloric restriction and spatial learning in old mice. *Physiol. Behav.* 60, 541–547.
- Benmerah, A., and Lamaze, C. (2002). Endocytose : chaque voie compte ! *MS Médecine Sci.* 18, 1126–1136.
- Bennett, W. F. D., and Tieleman, D. P. (2013). Computer simulations of lipid membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 1765–1776.
- Bergman, C., Gray-Scott, D., Chen, J.-J., and Meacham, S. (2009). What is next for the Dietary Reference Intakes for bone metabolism related nutrients beyond calcium: phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49, 136–144.
- 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.
- Bishop, N. A., Lu, T., and Yankner, B. A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* 464, 529–535.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L. L., Simonetti, R. G., and Gluud, C. (2008). Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD007176.
- Blalock, E. M., Chen, K.-C., Sharrow, K., Herman, J. P., Porter, N. M., Foster, T. C., and Landfield, P. W. (2003). Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 3807–3819.

- Blanchard, J., Wanka, L., Tung, Y.-C., Cárdenas-Aguayo, M. del C., LaFerla, F. M., Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (2010). Pharmacologic reversal of neurogenic and neuroplastic abnormalities and cognitive impairments without affecting A β and tau pathologies in 3xTg-AD mice. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 120, 605–621.
- Blanpain, N., and Chardon, O. (2010). Projections de population pour la France métropolitaine à l’horizon 2060. *Insee Prem.* N°1276.
- Bloch, J. *et al.* (2004). Neuroprotective gene therapy for Huntington’s disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum. Gene Ther.* 15, 968–975.
- Blom, K., Emmelot-Vonk, M. H., and Koek, H. L. (2013). The influence of vascular risk factors on cognitive decline in patients with dementia: a systematic review. *Maturitas* 76, 113–117.
- Blondeau, N. *et al.* (2009). Subchronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: a versatile potential therapy for stroke. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 34, 2548–2559.
- Boitard, C., Cavaroc, A., Sauvart, J., Aubert, A., Castanon, N., Layé, S., and Ferreira, G. (2014). Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain. Behav. Immun.*
- Bolognin, S., Buffelli, M., Puoliväli, J., and Iqbal, K. (2014). Rescue of cognitive-aging by administration of a neurogenic and/or neurotrophic compound. *Neurobiol. Aging* 35, 2134–2146.
- Bonkowski, M. S., Rocha, J. S., Masternak, M. M., Regaiey, K. A. Al, and Bartke, A. (2006). Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7901–7905.
- Boothby, L. A., and Doering, P. L. (2005). Vitamin C and vitamin E for Alzheimer’s disease. *Ann. Pharmacother.* 39, 2073–2080.
- Bosco, D., Fava, A., Plastino, M., Montalcini, T., and Pujia, A. (2011). Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer’s disease pathogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 1807–1821.
- Boustani, S. el, 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.
- Brenna, J. T., Salem, N., Sinclair, A. J., Cunnane, S. C., and International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, ISSFAL (2009). alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 80, 85–91.
- Brouwer, I. A., Wanders, A. J., and Katan, M. B. (2010). Effect of Animal and Industrial Trans Fatty Acids on HDL and LDL Cholesterol Levels in Humans - A Quantitative Review. *PLoS ONE* 5.
- Brown, D. A., and London, E. (1997). Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 1–7.
- Brown, D. A., and London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275, 17221–17224.
- Brzustowicz, M. R., Cherezov, V., Caffrey, M., Stillwell, W., and Wassall, S. R. (2002). Molecular organization of cholesterol in polyunsaturated membranes: microdomain formation. *Biophys. J.* 82, 285–298.
- Buffa, R., Floris, G. U., Putzu, P. F., and Marini, E. (2011). Body composition variations in ageing. *Coll. Antropol.* 35, 259–265.
- Buk, D. M., Waibel, M., Braig, C., Martens, A. S., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (2004). Polarity and lipid raft association of the components of the ciliary neurotrophic factor receptor complex in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Sci.* 117, 2063–2075.
- Bulló, M., Peeraully, M. R., Trayhurn, P., Folch, J., and Salas-Salvadó, J. (2007). Circulating nerve growth factor levels in relation to obesity and the metabolic syndrome in women. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 157, 303–310.
- Burdge, G. C., and Calder, P. C. (2005). Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 581–597.
- Burdge, G. C., Finnegan, Y. E., Minihane, A. M., Williams, C. M., and Wootton, S. A. (2003). Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [13C]alpha-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards beta-oxidation in older men. *Br. J. Nutr.* 90, 311–321.
- Burke, S. N., and Barnes, C. A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 30–40.
- Burnette, W. N. (1981). “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195–203.
- Burns, M., and Duff, K. (2002). Cholesterol in Alzheimer’s disease and tauopathy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 977, 367–375.
- Cabeza, R., Anderson, N. D., Locantore, J. K., and McIntosh, A. R. (2002). Aging Gracefully: Compensatory Brain Activity in High-Performing Older Adults. *NeuroImage* 17, 1394–1402.
- Calder, P. C. (2012). Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J. Nutr.* 142, 592S – 599S.
- Calon, F., Lim, G. P., Morihara, T., Yang, F., Ubada, O., Salem, N., Jr, Frautschy, S. A., and Cole, G. M. (2005). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid depletion activates caspases and decreases NMDA receptors in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Eur. J. Neurosci.* 22, 617–626.

- Cameron, P. L., Ruffin, J. W., Bollag, R., Rasmussen, H., and Cameron, R. S. (1997). Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 9520–9535.
- Cao, D., Lu, H., Lewis, T. L., and Li, L. (2007). Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* *282*, 36275–36282.
- Cassou, B. (1997). Mesurer le vieillissement biologique. *Actual. Doss. En Santé Publique*.
- Castellani, R. J., Rolston, R. K., and Smith, M. A. (2010). Alzheimer disease. *Dis.-Mon.* *DM 56*, 484–546.
- Castellano, C.-A., and Cunnane, S. (2012). Modifications de l'homéostasie du DHA au cours du vieillissement : conséquences pour la santé cognitive. *Médecine Sci. Am.* *1*.
- Cederholm, T., and Palmblad, J. (2010). Are omega-3 fatty acids options for prevention and treatment of cognitive decline and dementia? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *13*, 150–155.
- Cerqueira, F. M., and Kowaltowski, A. J. (2010). Commonly adopted caloric restriction protocols often involve malnutrition. *Ageing Res. Rev.* *9*, 424–430.
- Chadwick, W., Brennehan, R., Martin, B., and Maudsley, S. (2010). Complex and multidimensional lipid raft alterations in a murine model of Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* *2010*, 604792.
- Chalon, S. (2006). Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *75*, 259–269.
- Chalon, S., Delion-Vancassel, S., Belzung, C., Guilloteau, D., Leguisquet, A. M., Besnard, J. C., and Durand, G. (1998). Dietary fish oil affects monoaminergic neurotransmission and behavior in rats. *J. Nutr.* *128*, 2512–2519.
- Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D., and Gould, G. W. (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 5619–5624.
- Chang, A. M., and Halter, J. B. (2003). Aging and insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *284*, E7–E12.
- Cheng, H., Wang, M., Li, J.-L., Cairns, N. J., and Han, X. (2013). Specific changes of sulfatide levels in individuals with pre-clinical Alzheimer's disease: an early event in disease pathogenesis. *J. Neurochem.* *127*, 733–738.
- Cheon, Y. *et al.* (2012). Disturbed brain phospholipid and docosahexaenoic acid metabolism in calcium-independent phospholipase A(2)-VIA (iPLA(2) β)-knockout mice. *Biochim. Biophys. Acta* *1821*, 1278–1286.
- Chiba, T., Yamada, M., and Aiso, S. (2009a). Targeting the JAK2/STAT3 axis in Alzheimer's disease. *Expert Opin. Ther. Targets* *13*, 1155–1167.
- Chiba, T., Yamada, M., Sasabe, J., Terashita, K., Shimoda, M., Matsuoka, M., and Aiso, S. (2009b). Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. *Mol. Psychiatry* *14*, 206–222.
- Churchward, M. A., Rogasevskaia, T., Höfgen, J., Bau, J., and Coorssen, J. R. (2005). Cholesterol facilitates the native mechanism of Ca²⁺-triggered membrane fusion. *J. Cell Sci.* *118*, 4833–4848.
- Cillard, J., and Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Ol. Corps Gras Lipides* *13*, 24–29.
- Civelek, S., Konukoglu, D., Erdenen, F., and Uzun, H. (2013). Serum neurotrophic factor levels in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship to metabolic syndrome components. *Clin. Lab.* *59*, 369–374.
- CNEG (2010). *Vieillesse*, Paris: Masson.
- 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.
- Cole, G. M., and Frautschy, S. A. (2006). Docosahexaenoic acid protects from amyloid and dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Nutr. Health* *18*, 249–259.
- Cole, G. M., Ma, Q.-L., and Frautschy, S. A. (2009). Omega-3 fatty acids and dementia. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *81*, 213–221.
- Colombaioni, L., and Garcia-Gil, M. (2004). Sphingolipid metabolites in neural signalling and function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *46*, 328–355.
- Conejero-Goldberg, C., Hyde, T. M., Chen, S., Dreses-Werringloer, U., Herman, M. M., Kleinman, J. E., Davies, P., and Goldberg, T. E. (2011). Molecular signatures in post-mortem brain tissue of younger individuals at high risk for Alzheimer's disease as based on APOE genotype. *Mol. Psychiatry* *16*, 836–847.
- 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.
- Cooper, J. K. (2014). Nutrition and the brain: what advice should we give? *Neurobiol. Aging*.

- Cossec, J.-C., Simon, A., Marquer, C., Moldrich, R. X., Leterrier, C., Rossier, J., Duyckaerts, C., Lenkei, Z., and Potier, M.-C. (2010). Clathrin-dependent APP endocytosis and Abeta secretion are highly sensitive to the level of plasma membrane cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 846–852.
- Costantini, C., Scrable, H., and Puglielli, L. (2006). An aging pathway controls the TrkA to p75NTR receptor switch and amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.* 25, 1997–2006.
- Costantini, C., Weindruch, R., Valle, G. Della, and Puglielli, L. (2005). A TrkA-to-p75NTR molecular switch activates amyloid beta-peptide generation during aging. *Biochem. J.* 391, 59–67.
- Counter, C. M., Gupta, J., Harley, C. B., Leber, B., and Bacchetti, S. (1995). Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85, 2315–2320.
- Cremesti, A. E., Goni, F. M., and Kolesnick, R. (2002). Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Lett.* 531, 47–53.
- Crino, P. B., Ullman, M. D., Vogt, B. A., Bird, E. D., and Volicer, L. (1989). Brain gangliosides in dementia of the Alzheimer type. *Arch. Neurol.* 46, 398–401.
- Croll, S. D., Ip, N. Y., Lindsay, R. M., and Wiegand, S. J. (1998). Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. *Brain Res.* 812, 200–208.
- Cuddy, L. K., Winick-Ng, W., and Rylett, R. J. (2014). Regulation of the high-affinity choline transporter activity and trafficking by its association with cholesterol-rich lipid rafts. *J. Neurochem.* 128, 725–740.
- Cunnane, S. C., Chouinard-Watkins, R., Castellano, C. A., and Barberger-Gateau, P. (2013). Docosahexaenoic acid homeostasis, brain aging and Alzheimer's disease: Can we reconcile the evidence? *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 88, 61–70.
- 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.
- Cuvelier, C., Cabaraux, J.-F., Dufresne, I., Hornick, J.-L., and Istasse, L. (2004). Acides gras : nomenclature et sources alimentaires. *Ann. Médecine Vét.* 148, 133–140.
- Daneman, R. (2012). The blood-brain barrier in health and disease. *Ann. Neurol.* 72, 648–672.
- Dangour, A. D. *et al.* (2010). Effect of 2-γ n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on cognitive function in older people: a randomized, double-blind, controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 1725–1732.
- Dartigues, J. F., Fabrigoule, C., Letenneur, L., Amieva, H., Thiessard, F., and Orgogozo, J. M. (1997). [Epidemiology of memory disorders]. *Thérapie* 52, 503–506.
- Davidson, M. H., Johnson, J., Rooney, M. W., Kyle, M. L., and Kling, D. F. (2012). A novel omega-3 free fatty acid formulation has dramatically improved bioavailability during a low-fat diet compared with omega-3-acid ethyl esters: the ECLIPSE (Epanova®) compared to Lovaza®) in a pharmacokinetic single-dose evaluation) study. *J. Clin. Lipidol.* 6, 573–584.
- Davidson, T. L., Hargrave, S. L., Swithers, S. E., Sample, C. H., Fu, X., Kinzig, K. P., and Zheng, W. (2013). Inter-relationships among diet, obesity and hippocampal-dependent cognitive function. *Neuroscience* 253, 110–122.
- Davis, S., Aldrich, T. H., Stahl, N., Pan, L., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N. Y., and Yancopoulos, G. D. (1993). LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 260, 1805–1808.
- De-Fraja, C., Conti, L., Govoni, S., Battaini, F., and Cattaneo, E. (2000). STAT signalling in the mature and aging brain. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 18, 439–446.
- Delint-Ramirez, I., Maldonado Ruiz, R., Torre-Villalvazo, I., Fuentes-Mera, L., Garza Ocañas, L., Tovar, A., and Camacho, A. (2014). Genetic obesity alters recruitment of TANK-binding kinase 1 and AKT into hypothalamic lipid rafts domains. *Neurochem. Int.* 80C, 23–32.
- Delion, S., Chalon, S., Héroult, J., Guilloteau, D., Besnard, J. C., and Durand, G. (1994). Chronic dietary alpha-linolenic acid deficiency alters dopaminergic and serotonergic neurotransmission in rats. *J. Nutr.* 124, 2466–2476.
- 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.
- Denis, I., Potier, B., Vancassel, S., Heberden, C., and Lavielle, M. (2013). Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: body of evidence and possible mechanisms. *Ageing Res. Rev.* 12, 579–594.
- Denizart, C., Mathey, M. F., Crespin, H., and Lesourds, B. (2004). Le dépistage de la malnutrition du sujet âgé à l'entrée en institution. *Cah. Nutr. Diététique* 39, 55–84.
- Dereure, O., Marque, M., and Guillot, B. (2008). [Premature aging syndromes : From phenotype to gene]. *Ann. Dermatol. Vénérologie* 135, 466–478.
- Derouesné, C., Rapin, J.-R., and Lacomblez, L. (2004). [Memory complaints in 200 subjects meeting the diagnostic criteria for age-associated memory impairment: psychoaffective and cognitive correlates]. *Psychol. Neuropsychiatr. Vieil.* 2, 67–74.

- Desbène, C. *et al.* (2012). Critical role of cPLA2 in A β oligomer-induced neurodegeneration and memory deficit. *Neurobiol. Aging* 33, 1123.e17–e29.
- Després, J.-P., and Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881–887.
- Le Deun, P., and Gentric, A. (2007). Vieillesse réussie. *Médecine Thérapeutique* 13, 3–16.
- Dickson, B. J. (2003). Development. Wiring the brain with insulin. *Science* 300, 440–441.
- Ding, S., and Shen, C.-Y. (2008). Model of human aging: Recent findings on Werner's and Hutchinson-Gilford progeria syndromes. *Clin. Interv. Aging* 3, 431–444.
- Dowling, A. L. S., and Head, E. (2012). Antioxidants in the canine model of human aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 685–689.
- Drouet, B., Pinçon-Raymond, M., Chambaz, J., and Pillot, T. (2000). Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 705–715.
- Dubeau, S., Ferland, G., Gaudreau, P., Beaumont, E., and Lesage, F. (2011). Cerebrovascular hemodynamic correlates of aging in the Lou/c rat: a model of healthy aging. *NeuroImage* 56, 1892–1901.
- Dyall, S. C., Michael, G. J., Whelpton, R., Scott, A. G., and Michael-Titus, A. T. (2007). Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age-related decreases in the GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain. *Neurobiol. Aging* 28, 424–439.
- Eckhardt, M. (2008). The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Mol. Neurobiol.* 37, 93–103.
- 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. (Paris)* 58, 220–225.
- Eididin, M. (2003). The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32, 257–283.
- Ehringer, W., Belcher, D., Wassall, S. R., and Stillwell, W. (1990). A comparison of the effects of linolenic (18:3 omega 3) and docosahexaenoic (22:6 omega 3) acids on phospholipid bilayers. *Chem. Phys. Lipids* 54, 79–88.
- 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.
- Emsley, J. G., and Hagg, T. (2003). Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. *Exp. Neurol.* 183, 298–310.
- Erraji-Benchekroun, L., Underwood, M. D., Arango, V., Galfalvy, H., Pavlidis, P., Smyrniotopoulos, P., Mann, J. J., and Sibille, E. (2005). Molecular aging in human prefrontal cortex is selective and continuous throughout adult life. *Biol. Psychiatry* 57, 549–558.
- Eurostat (2013). Eurostat - Tables, Graphs and Maps Interface (TGM) table.
- Fabelo, N., Martín, V., Marín, R., Moreno, D., Ferrer, I., and Díaz, M. (2014). Altered lipid composition in cortical lipid rafts occurs at early stages of sporadic Alzheimer's disease and facilitates APP/BACE1 interactions. *Neurobiol. Aging*.
- Fang, M., He, D., Zhang, F., Hu, Z., Yang, J., Jiang, H., and Han, S. (2013). Antineuroinflammatory and neurotrophic effects of CNTF and C16 peptide in an acute experimental autoimmune encephalomyelitis rat model. *Front. Neuroanat.* 7, 44.
- Farooqui, A. A., Horrocks, L. A., and Farooqui, T. (2000). Deacylation and reacylation of neural membrane glycerophospholipids. *J. Mol. Neurosci.* 14, 123–135.
- Farooqui, A. A., Ong, W.-Y., and Horrocks, L. A. (2004). Biochemical aspects of neurodegeneration in human brain: involvement of neural membrane phospholipids and phospholipases A2. *Neurochem. Res.* 29, 1961–1977.
- Favrelère, S., Stadelmann-Ingand, S., Huguet, F., De Javel, D., Piriou, A., Tallineau, C., and Durand, G. (2000). Age-related changes in ethanolamine glycerophospholipid fatty acid levels in rat frontal cortex and hippocampus. *Neurobiol. Aging* 21, 653–660.
- Féart, C., Samieri, C., Allès, B., and Barberger-Gateau, P. (2013). Potential benefits of adherence to the Mediterranean diet on cognitive health. *Proc. Nutr. Soc.* 72, 140–152.
- Féart, C., Samieri, C., Rondeau, V., Amieva, H., Portet, F., Dartigues, J.-F., Scarmeas, N., and Barberger-Gateau, P. (2009). Adherence to a Mediterranean diet, cognitive decline, and risk of dementia. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 302, 638–648.
- Feller, S. E., Gawrisch, K., and MacKerell, A. D. (2002). Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 318–326.
- Ferrara, A., Barrett-Connor, E., and Shan, J. (1997). Total, LDL, and HDL cholesterol decrease with age in older men and women. The Rancho Bernardo Study 1984-1994. *Circulation* 96, 37–43.
- Ferrari, G., Anderson, B. L., Stephens, R. M., Kaplan, D. R., and Greene, L. A. (1995). Prevention of apoptotic neuronal death by GM1 ganglioside. Involvement of Trk neurotrophin receptors. *J. Biol. Chem.* 270, 3074–3080.
- Ferry, M., Mischis, C., Sidobre, B., Lambertin, A., and Barberger-Gateau, P. (2001). Bilan sur la situation alimentaire et nutritionnelle des personnes âgées vivant seules à domicile. L'étude SOLINUT.
- Fewlass, D. C., Noboa, K., Pi-Sunyer, F. X., Johnston, J. M., Yan, S. D., and Tezapsidis, N. (2004). Obesity-related leptin regulates Alzheimer's A β . *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 1870–1878.

- Filippov, V., Song, M. A., Zhang, K., Vinters, H. V., Tung, S., Kirsch, W. M., Yang, J., and Duerksen-Hughes, P. J. (2012). Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis. JAD* 29, 537–547.
- Fisher, B. J. (1995). Successful aging, life satisfaction, and generativity in later life. *Int. J. Aging Hum. Dev.* 41, 239–250.
- 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.
- 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.
- Forbes, G. B., and Reina, J. C. (1970). Adult lean body mass declines with age: some longitudinal observations. *Metabolism.* 19, 653–663.
- Foster, J. R. (1997). Successful coping, adaptation and resilience in the elderly: an interpretation of epidemiologic data. *Psychiatr. Q.* 68, 189–219.
- Foury, F., and Vanderstraeten, S. (1992). Yeast mitochondrial DNA mutators with deficient proofreading exonucleolytic activity. *EMBO J.* 11, 2717–2726.
- Franks, L. M. (1972). Theories of ageing: cellular aspects. *Proc. R. Soc. Med.* 65, 672–673.
- Frebel, K., and Wiese, S. (2006). Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1287–1290.
- Freije, J. M. P., and López-Otín, C. (2012). Reprogramming aging and progeria. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 757–764.
- Frisardi, V., Panza, F., Solfrizzi, V., Seripa, D., and Pilotto, A. (2010). Plasma lipid disturbances and cognitive decline. *J. Am. Geriatr. Soc.* 58, 2429–2430.
- Fujimoto, T., Hagiwara, H., Aoki, T., Kogo, H., and Nomura, R. (1998). Caveolae: from a morphological point of view. *J. Electron Microsc. (Tokyo)* 47, 451–460.
- Fulop, T., Larbi, A., Douziech, N., Levesque, I., Varin, A., and Herbein, G. (2006). Cytokine receptor signalling and aging. *Mech. Ageing Dev.* 127, 526–537.
- 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.
- Galli, T., Martinez-Arca, S., and Paumet, F. (2002). Mécanisme de la fusion membranaire. *MS Médecine Sci.* 18, 1113–1119.
- Gao, F., Taha, A. Y., Ma, K., Chang, L., Kiesewetter, D., and Rapoport, S. I. (2013). Aging decreases rate of docosahexaenoic acid synthesis-secretion from circulating unesterified α -linolenic acid by rat liver. *Age Dordr. Neth.* 35, 597–608.
- Gao, P., Shen, F., Gabriel, R. A., Law, D., Yang, E., Yang, G.-Y., Young, W. L., and Su, H. (2009). Attenuation of brain response to vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and neurogenesis in aged mice. *Stroke J. Cereb. Circ.* 40, 3596–3600.
- Garber, K. (2012). At loose ends: telomere theories of aging and cancer begin to converge. *J. Natl. Cancer Inst.* 104, 803–806.
- Garcia, P. *et al.* (2010). Ciliary neurotrophic factor cell-based delivery prevents synaptic impairment and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 7516–7527.
- Gavory, G., Farrow, M., and Balasubramanian, S. (2002). Minimum length requirement of the alignment domain of human telomerase RNA to sustain catalytic activity in vitro. *Nucleic Acids Res.* 30, 4470–4480.
- Gély-Nargeot, M. C., Mure, C., Guérin-Langlois, C., Martin, K., and Descours, I. (2000). [Effects of cognitive aging on memory performances]. *Presse Médicale Paris Fr.* 1983 29, 849–857.
- Gillery, P. (2006). Stress oxydant et glycation des protéines au cours du diabète sucré. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 64, 309–314.
- Gillette Guyonnet, S. *et al.* (2007). IANA task force on nutrition and cognitive decline with aging. *J. Nutr. Health Aging* 11, 132–152.
- Ginsberg, H. N., Zhang, Y.-L., and Hernandez-Ono, A. (2006). Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia. *Obes. Silver Spring Md* 14 *Suppl* 1, 41S – 49S.
- Giorgione, J., Epan, R. M., Buda, C., and Farkas, T. (1995). Role of phospholipids containing docosahexaenoyl chains in modulating the activity of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9767–9770.
- Giuliani, N., Sansoni, P., Girasole, G., Vescovini, R., Passeri, G., Passeri, M., and Pedrazzoni, M. (2001). Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and soluble gp130 exhibit different patterns of age- and menopause-related changes. *Exp. Gerontol.* 36, 547–557.
- Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 1131–1135.
- Goldsmith, T. C. (2013). Arguments against non-programmed aging theories. *Biochem. Biokhimiia* 78, 971–978.
- 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. *Med. Hypotheses* 77, 1114–1120.
- 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.

- Govoni, S., Amadio, M., Battaini, F., and Pascale, A. (2010). Senescence of the brain: focus on cognitive kinases. *Curr. Pharm. Des.* *16*, 660–671.
- Gow, A. J., Whiteman, M. C., Pattie, A., Whalley, L., Starr, J., and Deary, I. J. (2005). Lifetime intellectual function and satisfaction with life in old age: longitudinal cohort study. *BMJ* *331*, 141–142.
- Goyarzu, P. *et al.* (2004). Blueberry supplemented diet: effects on object recognition memory and nuclear factor-kappa B levels in aged rats. *Nutr. Neurosci.* *7*, 75–83.
- Gralle, M., and Ferreira, S. T. (2007). Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog. Neurobiol.* *82*, 11–32.
- Greco, S. J., Sarkar, S., Johnston, J. M., and Tezapsidis, N. (2009). Leptin regulates tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *380*, 98–104.
- Greco, S. J., Sarkar, S., Johnston, J. M., Zhu, X., Su, B., Casadesus, G., Ashford, J. W., Smith, M. A., and Tezapsidis, N. (2008). Leptin reduces Alzheimer's disease-related tau phosphorylation in neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *376*, 536–541.
- Greenberg, M. E., Xu, B., Lu, B., and Hempstead, B. L. (2009). New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 12764–12767.
- Grimm, M. O. W. *et al.* (2011a). Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms. *J. Biol. Chem.* *286*, 14028–14039.
- Grimm, M. O. W. *et al.* (2011b). Intracellular APP Domain Regulates Serine-Palmitoyl-CoA Transferase Expression and Is Affected in Alzheimer's Disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* *2011*, 695413.
- Grimm, M. O. W. *et al.* (2011c). Plasmalogen synthesis is regulated via alkyl-dihydroxyacetonephosphate-synthase by amyloid precursor protein processing and is affected in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *116*, 916–925.
- Guermouche, B., Soulimane-Mokhtari, N. A., Bouanane, S., Merzouk, H., Merzouk, S., and Narce, M. (2014). Effect of dietary n - 3 polyunsaturated fatty acids on oxidant/antioxidant status in macrosomic offspring of diabetic rats. *BioMed Res. Int.* *2014*, 368107.
- 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.
- Guichardant, M., Calzada, C., Bernoud-Hubac, N., Lagarde, M., and Véricel, E. (2015). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and oxygenated metabolism in atherothrombosis. *Biochim. Biophys. Acta* *1851*, 485–495.
- Guillet, C., Auguste, P., Mayo, W., Kreher, P., and Gascan, H. (1999). Ciliary neurotrophic factor is a regulator of muscular strength in aging. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 1257–1262.
- 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.
- Gu, Y., and Scarmeas, N. (2011). Dietary patterns in Alzheimer's disease and cognitive aging. *Curr. Alzheimer Res.* *8*, 510–519.
- 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.
- Hadders-Algra, M. (2011). Prenatal and early postnatal supplementation with long-chain polyunsaturated fatty acids: neurodevelopmental considerations. *Am. J. Clin. Nutr.* *94*, 1874S – 1879S.
- Hajjar, T., Meng, G. Y., Rajion, M. A., Vidyadaran, S., Othman, F., Farjam, A. S., Li, T. A., and Ebrahimi, M. (2012). Omega 3 polyunsaturated fatty acid improves spatial learning and hippocampal peroxisome proliferator activated receptors (PPAR α and PPAR γ) gene expression in rats. *BMC Neurosci.* *13*, 109.
- Halagappa, V. K. M., Guo, Z., Pearson, M., Matsuoka, Y., Cutler, R. G., LaFerla, F. M., and Mattson, M. P. (2007). Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* *26*, 212–220.
- Hall, D. A. (1972). Theories of ageing: extracellular aspects. *Proc. R. Soc. Med.* *65*, 671–672.
- Hanfstingl, B. (2013). Ego and Spiritual Transcendence: Relevance to Psychological Resilience and the Role of Age. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* *2013*.
- Hanninen, T., Koivisto, K., Reinikainen, K. J., Helkala, E. L., Soininen, H., Mykkänen, L., Laakso, M., and Riekkinen, P. J. (1996). Prevalence of ageing-associated cognitive decline in an elderly population. *Age Ageing* *25*, 201–205.
- Hansen, C. G., and Nichols, B. J. (2010). Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol.* *20*, 177–186.
- Han, X., Rozen, S., Boyle, S. H., Hellegers, C., Cheng, H., Burke, J. R., Welsh-Bohmer, K. A., Doraiswamy, P. M., and Kaddurah-Daouk, R. (2011). Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics. *PLoS One* *6*, e21643.
- Hanzal-Bayer, M. F., and Hancock, J. F. (2007). Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett.* *581*, 2098–2104.

- Haque, M. E., McIntosh, T. J., and Lentz, B. R. (2001). Influence of lipid composition on physical properties and peg-mediated fusion of curved and uncurved model membrane vesicles: "nature's own" fusogenic lipid bilayer. *Biochemistry (Mosc.)* *40*, 4340–4348.
- Hara, T. *et al.* (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* *441*, 885–889.
- Harbeby, E., Jouin, M., Alessandri, J.-M., Lallemand, M.-S., Linard, A., Lavielle, M., Huertas, A., Cunnane, S. C., and Guesnet, P. (2012). n-3 PUFA status affects expression of genes involved in neuroenergetics differently in the fronto-parietal cortex compared to the CA1 area of the hippocampus: effect of rest and neuronal activation in the rat. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *86*, 211–220.
- Harris, E., Kirk, J., Rowsell, R., Vitetta, L., Sali, A., Scholey, A. B., and Pipingas, A. (2011). The effect of multivitamin supplementation on mood and stress in healthy older men. *Hum. Psychopharmacol.* *26*, 560–567.
- Hartmann, T., Kuchenbecker, J., and Grimm, M. O. W. (2007). Alzheimer's disease: the lipid connection. *J. Neurochem.* *103 Suppl 1*, 159–170.
- Harvey, J. (2007). Leptin regulation of neuronal excitability and cognitive function. *Curr. Opin. Pharmacol.* *7*, 643–647.
- Hausman, D. B., Fischer, J. G., and Johnson, M. A. (2011). Nutrition in centenarians. *Maturitas* *68*, 203–209.
- Head, B. P. *et al.* (2010). Loss of caveolin-1 accelerates neurodegeneration and aging. *PLoS One* *5*, e15697.
- Head, B. P., Patel, H. H., and Insel, P. A. (2014). Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: Impact on signaling and function: Membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1838*, 532–545.
- Head, D., Buckner, R. L., Shimony, J. S., Williams, L. E., Akbudak, E., Conturo, T. E., McAvoy, M., Morris, J. C., and Snyder, A. Z. (2004). Differential vulnerability of anterior white matter in nondemented aging with minimal acceleration in dementia of the Alzheimer type: evidence from diffusion tensor imaging. *Cereb. Cortex N. Y. N* *1991 14*, 410–423.
- Head, E. (2009). Oxidative damage and cognitive dysfunction: antioxidant treatments to promote healthy brain aging. *Neurochem. Res.* *34*, 670–678.
- Head, E., Nukala, V. N., Fenoglio, K. A., Muggenburg, B. A., Cotman, C. W., and Sullivan, P. G. (2009). Effects of age, dietary, and behavioral enrichment on brain mitochondria in a canine model of human aging. *Exp. Neurol.* *220*, 171–176.
- Heese, K., Low, J. W., and Inoue, N. (2006). Nerve growth factor, neural stem cells and Alzheimer's disease. *Neurosignals* *15*, 1–12.
- van der Heide, L. P., Ramakers, G. M. J., and Smidt, M. P. (2006). Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog. Neurobiol.* *79*, 205–221.
- Hein, E.-M., Blank, L. M., Heyland, J., Baumbach, J. I., Schmid, A., and Hayen, H. (2009). Glycerophospholipid profiling by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry using exact mass measurements and multi-stage mass spectrometric fragmentation experiments in parallel. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *RCM 23*, 1636–1646.
- Hennigan, A., O'Callaghan, R. M., and Kelly, A. M. (2007). Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 424–427.
- Henrard, J.-C. (1997). Vieillesse, âge et santé. *Actual. Doss. En Santé Publique*.
- Hepp, R., Grant, N. J., Aunis, D., and Langley, K. (2000). SNAP-25 regulation during adrenal gland development: comparison with differentiation markers and other SNAREs. *J. Comp. Neurol.* *421*, 533–542.
- Hernández-Sánchez, C., Rubio, E., Serna, J., de la Rosa, E. J., and de Pablo, F. (2002). Unprocessed proinsulin promotes cell survival during neurulation in the chick embryo. *Diabetes* *51*, 770–777.
- Ho, L. *et al.* (2004). Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.*
- Holub, B. J. (2009). Docosahexaenoic acid (DHA) and cardiovascular disease risk factors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *81*, 199–204.
- 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.
- Hou, Q., Huang, Y., Amato, S., Snyder, S. H., Haganir, R. L., and Man, H.-Y. (2008). Regulation of AMPA receptor localization in lipid rafts. *Mol. Cell. Neurosci.* *38*, 213–223.
- Houtkooper, R. H., Argmann, C., Houten, S. M., Cantó, C., Jenjina, 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.
- Huang, C. S., Zhou, J., Feng, A. K., Lynch, C. C., Klumperman, J., DeArmond, S. J., and Mobley, W. C. (1999). Nerve growth factor signaling in caveolae-like domains at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* *274*, 36707–36714.
- Ichikawa, N. *et al.* (2009). Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. *J. Cell Sci.* *122*, 289–299.
- Ikezu, T. *et al.* (1998). Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res.* *804*, 177–192.
- INED (2011). Les espérances de vie sans incapacité en France. *Doc. Trav.*

- INED (2012). Les dernières données sur l'espérance de vie en bonne santé dans les 27 pays de l'UE. Commun. Presse.
- INED (2014). Le vieillissement démographique en Europe.
- Inomata, M., Shimada, Y., Hayashi, M., Kondo, H., and Ohno-Iwashita, Y. (2006). Detachment-associated changes in lipid rafts of senescent human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *343*, 489–495.
- Insee (2011). Insee - Santé - Évolution de l'espérance de vie et de l'espérance de vie en bonne santé dans l'Union européenne.
- Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (2010). Alzheimer's disease, a multifactorial disorder seeking multitherapies. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* *6*, 420–424.
- Ittner, L. M., and Götz, J. (2011). Amyloid- β and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 65–72.
- IUPAC-IUB (1977). The nomenclature of lipids. (Recommendations 1976). IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *Hoppe-Seylers Z. Für Physiol. Chem.* *358*, 617–631.
- Jena, B. P. (2011). Role of SNAREs in membrane fusion. *Adv. Exp. Med. Biol.* *713*, 13–32.
- Jiang, C. H., Tsien, J. Z., Schultz, P. G., and Hu, Y. (2001). The effects of aging on gene expression in the hypothalamus and cortex of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 1930–1934.
- Jiang, L., Fang, J., Moore, D. S., Gogichaeva, N. V., Galeva, N. A., Michaelis, M. L., and Zaidi, A. (2010). Age-associated changes in synaptic lipid raft proteins revealed by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis. *Neurobiol. Aging* *31*, 2146–2159.
- Jicha, G. A., and Markesbery, W. R. (2010). Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease. *Clin. Interv. Aging* *5*, 45–61.
- 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.
- John, B. A., Meister, M., Banning, A., and Tikkanen, R. (2014). Flotillins bind to the dileucine sorting motif of β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and influence its endosomal sorting. *FEBS J.* *281*, 2074–2087.
- 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.
- Joseph, J. A., Villalobos-Molinas, R., Denisova, N. A., Erat, S., and Strain, J. (1997). Cholesterol: a two-edged sword in brain aging. *Free Radic. Biol. Med.* *22*, 455–462.
- Joseph, J., Cole, G., Head, E., and Ingram, D. (2009). Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 12795–12801.
- 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. (2002). Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* *13*, 155–164.
- 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. Bethesda Md* *2*, 304–316.
- Kaur, N., Wohlhueter, A. L., and Halvorsen, S. W. (2002). Activation and inactivation of signal transducers and activators of transcription by ciliary neurotrophic factor in neuroblastoma cells. *Cell. Signal.* *14*, 419–429.
- Kawakita, E., Hashimoto, M., and Shido, O. (2006). Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. *Neuroscience* *139*, 991–997.
- Kearns, S. D., and Haag, M. (2002). The effect of omega-3 fatty acids on Ca-ATPase in rat cerebral cortex. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *67*, 303–308.
- Keys, A., Menotti, A., Karvonen, M. J., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Djordjevic, B. S., Dontas, A. S., Fidanza, F., and Keys, M. H. (1986). The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am. J. Epidemiol.* *124*, 903–915.
- Kirkham, M., and Parton, R. G. (2005). Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1745*, 273–286.
- Kitajka, K., Puskás, L. G., Zvara, A., Hackler, L., 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.
- Knight, E. M., Martins, I. V., Gümüşgöz, S., Allan, S. M., and Lawrence, C. B. (2014). High-fat diet-induced memory impairment in triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTgAD) mice is independent of changes in amyloid and tau pathology. *Neurobiol. Aging*.
- 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.
- Koenig, B. W., Strey, H. H., and Gawrisch, K. (1997). Membrane lateral compressibility determined by NMR and x-ray diffraction: effect of acyl chain polyunsaturation. *Biophys. J.* *73*, 1954–1966.
- Kokubo, H., Helms, J. B., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Horikoshi, Y., and Yamaguchi, H. (2003). Ultrastructural localization of flotillin-1 to cholesterol-rich membrane microdomains, rafts, in rat brain tissue. *Brain Res.* *965*, 83–90.

- Komatsu, M. *et al.* (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* *441*, 880–884.
- Kononen, J., Hökfelt, T., and Peltö-Huikko, M. (1995). Effects of aging on the expression of neurotrophins and their receptors in the rat pituitary gland. *Neuroreport* *6*, 2429–2434.
- 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.
- Kroner, Z. (2009). The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* *14*, 373–379.
- Kume, K., Hanyu, H., Sato, T., Hirao, K., Shimizu, S., Kanetaka, H., Sakurai, H., and Iwamoto, T. (2011). Vascular risk factors are associated with faster decline of Alzheimer disease: a longitudinal SPECT study. *J. Neurol.* *258*, 1295–1303.
- Kumosani, T. A., and Moselhy, S. S. (2011). Modulatory effect of cod-liver oil on Na(+)-K(+) ATPase in rats' brain. *Hum. Exp. Toxicol.* *30*, 267–274.
- Kurzchalia, T. V., and Parton, R. G. (1999). Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 424–431.
- 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.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Lagarde, M., Bernoud-Hubac, N., Calzada, C., Véricel, E., and Guichardant, M. (2013). Lipidomics of essential fatty acids and oxygenated metabolites. *Mol. Nutr. Food Res.* *57*, 1347–1358.
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A., and Dautry-Varsat, A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell* *7*, 661–671.
- Lambert, J. E., and Parks, E. J. (2012). Postprandial metabolism of meal triglyceride in humans. *Biochim. Biophys. Acta* *1821*, 721–726.
- Lane, K., Derbyshire, E., Li, W., and Brennan, C. (2014). Bioavailability and Potential Uses of Vegetarian Sources of Omega-3 Fatty Acids: A Review of the Literature. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *54*, 572–579.
- Langelier, B., Linard, A., Bordat, C., Lavielle, M., and Heberden, C. (2010). Long chain-polyunsaturated fatty acids modulate membrane phospholipid composition and protein localization in lipid rafts of neural stem cell cultures. *J. Cell. Biochem.* *110*, 1356–1364.
- Latour, A., Grintal, B., Champeil-Potokar, G., Hennebelle, M., Lavielle, M., Dutar, P., Potier, B., Billard, J.-M., Vancassel, S., and Denis, I. (2013). Omega-3 fatty acids deficiency aggravates glutamatergic synapse and astroglial aging in the rat hippocampal CA1. *Aging Cell* *12*, 76–84.
- Lavielle, M., Champeil-Potokar, G., Isabelle Denis, Philippe Guesnet, Fabien Pifferi, and Sylvie Vancassel (2007). Le DHA dans la neurotransmission. *Ol. Corps Gras Lipides* *14*, 11–15.
- Lavielle, M., and Layé, S. (2010). Acides gras poly-insaturés (omega3, omega 6) et fonctionnement du système nerveux central. *Innov. Agron.* *10*, 25–42.
- Lawson, L. D., and Hughes, B. G. (1988). Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acids, or ethyl esters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *152*, 328–335.
- Layé, S. (2010). Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *82*, 295–303.
- Lebert, F., Boitte, P., de Bouvet, A., and Pasquier, F. (2012). [Alzheimer's disease and related disorders: specificity of young onset patients, including ethical aspects]. *Gériatrie Psychol. Neuropsychiatr. Vieil.* *10*, 65–72.
- 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.
- Ledesma, M. D., Da Silva, J. S., Schevchenko, A., Wilm, M., and Dotti, C. G. (2003). Proteomic characterisation of neuronal sphingolipid-cholesterol microdomains: role in plasminogen activation. *Brain Res.* *987*, 107–116.
- Lee, M. Y., Deller, T., Kirsch, M., Frotscher, M., and Hofmann, H. D. (1997). Differential regulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha expression in astrocytes and neurons of the fascia dentata after entorhinal cortex lesion. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 1137–1146.
- Lee, P., Kim, J., Williams, R., Sandhir, R., Gregory, E., Brooks, W. M., and Berman, N. E. J. (2012). Effects of aging on blood brain barrier and matrix metalloproteases following controlled cortical impact in mice. *Exp. Neurol.* *234*, 50–61.
- Legrand, P. (2007). Les Acides Gras : Structures, Fonctions, Apports Nutritionnels Conseillés. *Cah. Nutr. Diététique* *42, Supplement 1*, 7–12.
- Leibinger, M., Andreadaki, A., Diekmann, H., and Fischer, D. (2013). Neuronal STAT3 activation is essential for CNTF- and inflammatory stimulation-induced CNS axon regeneration. *Cell Death Dis.* *4*, e805.
- 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.
- Lerno, L. A., German, J. B., and Lebrilla, C. B. (2010). A Method for the Identification of Lipid Classes Based on Referenced Kendrick Mass Analysis. *Anal. Chem.* *82*, 4236–4245.

- Létondor, A., Buaud, B., Vaysse, C., Fonseca, L., Herrouin, C., Servat, B., Layé, S., Pallet, V., and Alfos, S. (2014). Erythrocyte DHA level as a biomarker of DHA status in specific brain regions of n-3 long-chain PUFA-supplemented aged rats. *Br. J. Nutr.* *112*, 1805–1818.
- Liao, C.-Y., Rikke, B. A., Johnson, T. E., Diaz, V., and Nelson, J. F. (2010). Genetic variation in the murine lifespan response to dietary restriction: from life extension to life shortening. *Aging Cell* *9*, 92–95.
- 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, L., Cao, D., Garber, D. W., Kim, H., and Fukuchi, K. (2003). Association of aortic atherosclerosis with cerebral beta-amyloidosis and learning deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* *163*, 2155–2164.
- Linder, D. E., Freeman, L. M., Morris, P., German, A. J., Biourge, V., Heinze, C., and Alexander, L. (2012). Theoretical evaluation of risk for nutritional deficiency with caloric restriction in dogs. *Vet. Q.* *32*, 123–129.
- Lin, M. T., and Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* *443*, 787–795.
- Li, Q., Wang, M., Tan, L., Wang, C., Ma, J., Li, N., Li, Y., Xu, G., and Li, J. (2005). Docosahexaenoic acid changes lipid composition and interleukin-2 receptor signaling in membrane rafts. *J. Lipid Res.* *46*, 1904–1913.
- Liu, X. *et al.* (2014). Impaired synaptic vesicle recycling contributes to presynaptic dysfunction in lipoprotein lipase-deficient mice. *Neuroscience* *280*, 275–281.
- Loerch, P. M. *et al.* (2008). Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. *PLoS One* *3*, e3329.
- López, G. H., Ilincheta de Boschero, M. G., Castagnet, P. I., and Giusto, N. M. (1995). Age-associated changes in the content and fatty acid composition of brain glycerophospholipids. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *112*, 331–343.
- Luchsinger, J. A., Patel, B., Tang, M.-X., Schupf, N., and Mayeux, R. (2007). Measures of adiposity and dementia risk in elderly persons. *Arch. Neurol.* *64*, 392–398.
- Lupien, S. J., and Wan, N. (2004). Successful ageing: from cell to self. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *359*, 1413–1426.
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S.-Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J., and Yankner, B. A. (2004). Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* *429*, 883–891.
- Maccioni, R. B., Muñoz, J. P., and Barbeito, L. (2001). The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch. Med. Res.* *32*, 367–381.
- 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.
- Maesako, M. *et al.* (2012). Exercise is more effective than diet control in preventing high fat diet-induced β -amyloid deposition and memory deficit in amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Biol. Chem.* *287*, 23024–23033.
- Magnani, F., Tate, C. G., Wynne, S., Williams, C., and Haase, J. (2004). Partitioning of the serotonin transporter into lipid microdomains modulates transport of serotonin. *J. Biol. Chem.* *279*, 38770–38778.
- 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.
- Malenka, R. C. (2003). Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1003*, 1–11.
- Marin, R., Rojo, J. A., Fabelo, N., Fernandez, C. E., and Diaz, M. (2013). Lipid raft disarrangement as a result of neuropathological progresses: A novel strategy for early diagnosis? *Neuroscience* *245*, 26–39.
- Marquet-de Rougé, P., Clamagirand, C., Facchinetti, P., Rose, C., Sargueil, F., Guihenneuc-Jouyau, C., Cynober, L., Moinard, C., and Allinquant, B. (2013). Citrulline diet supplementation improves specific age-related raft changes in wild-type rodent hippocampus. *Age Dordr. Neth.* *35*, 1589–1606.
- Martin, M. G., Perga, S., Trovò, L., Rasola, A., Holm, P., Rantamäki, T., Harkany, T., Castrén, E., Chiara, F., and Dotti, C. G. (2008). Cholesterol loss enhances TrkB signaling in hippocampal neurons aging in vitro. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2101–2112.
- Martín, V., Fabelo, N., Santpere, G., Puig, B., Marín, R., Ferrer, I., and Díaz, M. (2010). Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex. *J. Alzheimers Dis. JAD* *19*, 489–502.
- Mathers, J. C. (2013). Nutrition and ageing: knowledge, gaps and research priorities. *Proc. Nutr. Soc.* *72*, 246–250.
- Matsuzaki, H., Tamatani, M., Mitsuda, N., Namikawa, K., Kiyama, H., Miyake, S., and Tohyama, M. (1999). Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J. Neurochem.* *73*, 2037–2046.
- Maxfield, F. R., and Wüstner, D. (2002). Intracellular cholesterol transport. *J. Clin. Invest.* *110*, 891–898.
- Mayor, S., and Maxfield, F. R. (1995). Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment. *Mol. Biol. Cell* *6*, 929–944.

- Mazelova, J., Ransom, N., Astuto-Gribble, L., Wilson, M. C., and Deretic, D. (2009). Syntaxin 3 and SNAP-25 pairing, regulated by omega-3 docosahexaenoic acid, controls the delivery of rhodopsin for the biogenesis of cilia-derived sensory organelles, the rod outer segments. *J. Cell Sci.* *122*, 2003–2013.
- Maziere, J.-C. (1997). Lipides et vieillissement cellulaire. *Ol. Corps Gras Lipides* *4*, 266–271.
- McCormick, D. B. (2012). Vitamin/trace mineral supplements for the elderly. *Adv. Nutr. Bethesda Md* *3*, 822–824.
- Mc Daniel, J. (2013). Inflammation, Free Radicals and the Health Benefits of Nuts.
- McNamara, R. K., Liu, Y., Jandacek, R., Rider, T., and Tso, P. (2008). The aging human orbitofrontal cortex: decreasing polyunsaturated fatty acid composition and associated increases in lipogenic gene expression and stearoyl-CoA desaturase activity. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *78*, 293–304.
- Meléndez, A., Tallóczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.-L., Hall, D. H., and Levine, B. (2003). Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* *301*, 1387–1391.
- Mencarelli, C., and Martinez-Martinez, P. (2013). Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *70*, 181–203.
- Merkel, M., Heeren, J., Dudeck, W., Rinninger, F., Radner, H., Breslow, J. L., Goldberg, I. J., Zechner, R., and Greten, H. (2002). Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. *J. Biol. Chem.* *277*, 7405–7411.
- Merry, B. J. (1987). Biological mechanisms of ageing. *Eye Lond. Engl.* *1 (Pt 2)*, 163–170.
- Metcalfe, R. G., James, M. J., Gibson, R. A., Edwards, J. R., Stubberfield, J., Stuklis, R., Roberts-Thomson, K., Young, G. D., and Cleland, L. G. (2007). Effects of fish-oil supplementation on myocardial fatty acids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* *85*, 1222–1228.
- Michel, V., and Bakovic, M. (2007). Lipid rafts in health and disease. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *99*, 129–140.
- Mill, J. F., Chao, M. V., and Ishii, D. N. (1985). Insulin, insulin-like growth factor II, and nerve growth factor effects on tubulin mRNA levels and neurite formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 7126–7130.
- Mineo, C., Gill, G. N., and Anderson, R. G. (1999). Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J. Biol. Chem.* *274*, 30636–30643.
- Mingam, R., Moranis, A., Bluthé, R.-M., De Smedt-Peyrusse, V., Kelley, K. W., Guesnet, P., Lavielle, M., Dantzer, R., and Layé, S. (2008). Uncoupling of interleukin-6 from its signalling pathway by dietary n-3-polyunsaturated fatty acid deprivation alters sickness behaviour in mice. *Eur. J. Neurosci.* *28*, 1877–1886.
- Ministère des Affaires sociales et de la Santé (2011). Programme national nutrition santé 2011-2015.
- Miquet, J. G., Sotelo, A. I., Dominici, F. P., Bonkowski, M. S., Bartke, A., and Turyn, D. (2005). Increased sensitivity to GH in liver of Ames dwarf (Prop1df/Prop1df) mice related to diminished CIS abundance. *J. Endocrinol.* *187*, 387–397.
- Mitchell, D. C., and Litman, B. J. (1998). Molecular order and dynamics in bilayers consisting of highly polyunsaturated phospholipids. *Biophys. J.* *74*, 879–891.
- Mitchell, R. W., and Hatch, G. M. (2011). Fatty acid transport into the brain: of fatty acid fables and lipid tails. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *85*, 293–302.
- Mitchell, R. W., On, N. H., Del Bigio, M. R., Miller, D. W., and Hatch, G. M. (2011). Fatty acid transport protein expression in human brain and potential role in fatty acid transport across human brain microvessel endothelial cells. *J. Neurochem.* *117*, 735–746.
- Mocchetti, I. (2005). Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *62*, 2283–2294.
- Mondin, M., Labrousse, V., Hosy, E., Heine, M., Tessier, B., Levet, F., Pujol, C., Blanchet, C., Choquet, D., and Thoumine, O. (2011). Neurexin-neuroigin adhesions capture surface-diffusing AMPA receptors through PSD-95 scaffolds. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 13500–13515.
- Mora, F., Segovia, G., and Del Arco, A. (2008). Glutamate-dopamine-GABA interactions in the aging basal ganglia. *Brain Res. Rev.* *58*, 340–353.
- Moreira, E. L. G., de Oliveira, J., Engel, D. F., Walz, R., de Bem, A. F., Farina, M., and Prediger, R. D. S. (2014). Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event? *J. Neural Transm. Vienna Austria* *121*, 415–426.
- Morris, M. C. (2012). Nutritional determinants of cognitive aging and dementia. *Proc. Nutr. Soc.* *71*, 1–13.
- Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Tangney, C. C., Bennett, D. A., Aggarwal, N., Schneider, J., and Wilson, R. S. (2003). Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* *60*, 194–200.
- Morrison, C. D. (2009). Leptin signaling in brain: A link between nutrition and cognition? *Biochim. Biophys. Acta* *1792*, 401–408.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* *11*, 47–60.
- Morrow, I. C., and Parton, R. G. (2005). Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. *Traffic Cph. Den.* *6*, 725–740.

- Moskalev, A. A., Aliper, A. M., Smit-McBride, Z., Buzdin, A., and Zhavoronkov, A. (2014). Genetics and epigenetics of aging and longevity. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 1063–1077.
- Mukherjee, S., and Maxfield, F. R. (2000). Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking. *Traffic Cph. Den.* 1, 203–211.
- Müller, S., Chakrapani, B. P. S., Schwegler, H., Hofmann, H.-D., and Kirsch, M. (2009). Neurogenesis in the dentate gyrus depends on ciliary neurotrophic factor and signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 431–441.
- Mun, S., Decker, E., and McClements, J. (2007). Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Res. Int.* 40, 770–781.
- Murakami, M. (2011). Lipid mediators in life science. *Exp. Anim. Jpn. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 60, 7–20.
- Murer, M. G., Yan, Q., and Raisman-Vozari, R. (2001). Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 63, 71–124.
- Muto, Y., Hayashi, T., Higashi, Y., Endo, T., Yamamoto, T., and Sato, K. (1999). Age-related decrease in brain-derived neurotrophic factor gene expression in the brain of the zitter rat with genetic spongiform encephalopathy. *Neurosci. Lett.* 271, 69–72.
- Nabi, I. R., and Le, P. U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* 161, 673–677.
- Nebl, T., Pestonjamas, K. N., Leszyk, J. D., Crowley, J. L., Oh, S. W., and Luna, E. J. (2002). Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 277, 43399–43409.
- Needels, D. L., Nieto-Sampedro, M., Whittemore, S. R., and Cotman, C. W. (1985). Neuronotrophic activity for ciliary ganglion neurons. Induction following injury to the brain of neonatal, adult, and aged rats. *Brain Res.* 350, 275–284.
- Negre-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau, C., and Salvayre, R. (2008). Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* 153, 6–20.
- 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.
- Neumann-Giesen, C., Falkenbach, B., Beicht, P., Claasen, S., Lüers, G., Stuermer, C. A. O., Herzog, V., and Tikkanen, R. (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochem. J.* 378, 509–518.
- Ngezahayo, A., Schachner, M., and Artola, A. (2000). Synaptic activity modulates the induction of bidirectional synaptic changes in adult mouse hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 2451–2458.
- Nichols, B. (2003). Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J. Cell Sci.* 116, 4707–4714.
- Niu, S.-L., Mitchell, D. C., and Litman, B. J. (2005). Trans Fatty Acid Derived Phospholipids Show Increased Membrane Cholesterol and Reduced Receptor Activation as Compared to Their Cis Analogs. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 4458–4465.
- Nubukpo, P., and Clement, J. P. (2004). Mild cognitive impairment (MCI) : Déficit cognitif léger ou pré-démence? Du bon usage du concept. *Année Gériatrique* 18, 267–291.
- Numakawa, T., Suzuki, S., Kumamaru, E., Adachi, N., Richards, M., and Kunugi, H. (2010). BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol. Histopathol.* 25, 237–258.
- ObEpi (2012). ObEpi-Roche 2012 : enquête nationale sur l'obésité et le surpoids.
- Oberdoerffer, P. *et al.* (2008). SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 135, 907–918.
- Oksman, M., Iivonen, H., Högges, 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.
- OMS (2012a). OMS | 10 faits sur le vieillissement et la qualité de vie.
- OMS (2012b). OMS | La démence.
- OMS (2013a). Obésité et surpoids.
- OMS (2013b). OMS | Maladies cardio-vasculaires.
- ONU (2011). Département des affaires économiques et sociales.
- Opii, W. O., Joshi, G., Head, E., Milgram, N. W., Muggenburg, B. A., Klein, J. B., Pierce, W. M., Cotman, C. W., and Butterfield, D. A. (2008). Proteomic identification of brain proteins in the canine model of human aging following a long-term treatment with antioxidants and a program of behavioral enrichment: relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 29, 51–70.
- Oster, T., and Pillot, T. (2010). Docosahexaenoic acid and synaptic protection in Alzheimer's disease mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 791–798.

- Oyler, G. A., Polli, J. W., Wilson, M. C., and Billingsley, M. L. (1991). Developmental expression of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 5247–5251.
- Paban, V., Billard, J.-M., Bouet, V., Freret, T., Boulouard, M., Chambon, C., Lloriod, B., and Alescio-Lautier, B. (2013). Genomic transcriptional profiling in LOU/C/Jall rats identifies genes for successful aging. *Brain Struct. Funct.* *218*, 1501–1512.
- Panchal, M. *et al.* (2014). Ceramides and sphingomyelinases in senile plaques. *Neurobiol. Dis.* *65*, 193–201.
- Panchal, M., Loeper, J., Cossec, J.-C., Perruchini, C., Lazar, A., Pompon, D., and Duyckaerts, C. (2010). Enrichment of cholesterol in microdissected Alzheimer's disease senile plaques as assessed by mass spectrometry. *J. Lipid Res.* *51*, 598–605.
- Park, D. C., and Yeo, S. G. (2013). Aging. *Korean J. Audiol.* *17*, 39–44.
- Park, S. H., Kim, J. H., Choi, K. H., Jang, Y. J., Bae, S. S., Choi, B. T., and Shin, H. K. (2013). Hypercholesterolemia accelerates amyloid β -induced cognitive deficits. *Int. J. Mol. Med.* *31*, 577–582.
- Parmryd, I., and Onfelt, B. (2013). Consequences of membrane topography. *FEBS J.* *280*, 2775–2784.
- Pasinetti, G. M., and Eberstein, J. A. (2008). METABOLIC SYNDROME AND THE ROLE OF DIETARY LIFESTYLES IN ALZHEIMER'S DISEASE. *J. Neurochem.* *106*, 1503–1514.
- Pastorino, L., and Lu, K. P. (2006). Pathogenic mechanisms in Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* *545*, 29–38.
- Pawlosky, R. J., Hibbeln, J. R., Novotny, J. A., and Salem, N. (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. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates.*, George Paxinos, Keith B.J. Franklin (San Diego, Calif.; London: Academic).
- Payette, H., Gray-Donald, K., Cyr, R., and Boutier, V. (1995). Predictors of dietary intake in a functionally dependent elderly population in the community. *Am. J. Public Health* *85*, 677–683.
- Pélerin, H., Jouin, M., Lallemand, M.-S., Alessandri, J.-M., Cunnane, S. C., Langelier, B., and Guesnet, P. (2014). Gene expression of fatty acid transport and binding proteins in the blood-brain barrier and the cerebral cortex of the rat: Differences across development and with different DHA brain status. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*.
- Pereira, D. B., and Chao, M. V. (2007). The tyrosine kinase Fyn determines the localization of TrkB receptors in lipid rafts. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 4859–4869.
- Petersen, R. C., Smith, G. E., Waring, S. C., Ivnik, R. J., Tangalos, E. G., and Kokmen, E. (1999). Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch. Neurol.* *56*, 303–308.
- Pfefferbaum, A., Sullivan, E. V., and Adalsteinsson, E. (2005). Frontal circuitry degradation marks healthy adult aging: Evidence from diffusion tensor imaging. *NeuroImage* *26*, 891–899.
- Pfefferbaum, A., Sullivan, E. V., Hedehus, M., Lim, K. O., Adalsteinsson, E., and Moseley, M. (2000). Age-related decline in brain white matter anisotropy measured with spatially corrected echo-planar diffusion tensor imaging. *Magn. Reson. Med. Off. J. Soc. Magn. Reson. Med. Soc. Magn. Reson. Med.* *44*, 259–268.
- Phivilay, A., Julien, C., Tremblay, C., Berthiaume, L., Julien, P., Giguère, Y., and Calon, F. (2009). High dietary consumption of trans fatty acids decreases brain docosahexaenoic acid but does not alter amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* *159*, 296–307.
- Pike, L. J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* *44*, 655–667.
- Pike, L. J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem. J.* *378*, 281–292.
- Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* *47*, 1597–1598.
- Pike, L. J., Han, X., Chung, K.-N., and Gross, R. W. (2002). Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 2075–2088.
- Pike, L. J., Han, X., and Gross, R. W. (2005). Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids: a shotgun lipidomics study. *J. Biol. Chem.* *280*, 26796–26804.
- 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.
- Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Talusot, C., Brasseur, R., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., and Lins, L. (1996). Fusogenic Properties of the C-terminal Domain of the Alzheimer β -Amyloid Peptide. *J. Biol. Chem.* *271*, 28757–28765.
- Pinçon, A. *et al.* (2015). Increased Susceptibility of Dyslipidemic LSR+/- Mice to Amyloid Stress is Associated with Changes in Cortical Cholesterol Levels. *J. Alzheimers Dis. JAD* *45*, 195–204.
- Piper, M. D. W., Partridge, L., Raubenheimer, D., and Simpson, S. J. (2011). Dietary Restriction and Aging: A Unifying Perspective. *Cell Metab.* *14*, 154–160.

- 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. Physiol. Appliquée Nutr. Métabolisme* 32, 619–634.
- Podlutzky, A. J., Khritankov, A. M., Ovodov, N. D., and Austad, S. N. (2005). A new field record for bat longevity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 60, 1366–1368.
- Poling, J. S., Karanian, J. W., Salem, N., and Vicini, S. (1995). Time- and voltage-dependent block of delayed rectifier potassium channels by docosahexaenoic acid. *Mol. Pharmacol.* 47, 381–390.
- Poling, J. S., Vicini, S., Rogawski, M. A., and Salem, N. (1996). Docosahexaenoic acid block of neuronal voltage-gated K⁺ channels: subunit selective antagonism by zinc. *Neuropharmacology* 35, 969–982.
- Pollock, R. D., Carter, S., Velloso, C. P., Duggal, N. A., Lord, J. M., Lazarus, N. R., and Harridge, S. D. R. (2015). An investigation into the relationship between age and physiological function in highly active older adults. *J. Physiol.*, n/a – n/a.
- Pommier, J. P., Lebeau, J., Ducray, C., and Sabatier, L. (1995). Chromosomal instability and alteration of telomere repeat sequences. *Biochimie* 77, 817–825.
- Pongrac, J. L., Slack, P. J., and Innis, S. M. (2007). Dietary polyunsaturated fat that is low in (n-3) and high in (n-6) fatty acids alters the SNARE protein complex and nitrosylation in rat hippocampus. *J. Nutr.* 137, 1852–1856.
- Posse de Chaves, E., and Sipione, S. (2010). Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS Lett.* 584, 1748–1759.
- Preston, J. E., Joan Abbott, N., and Begley, D. J. (2014). Transcytosis of macromolecules at the blood-brain barrier. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 71, 147–163.
- Prinetti, A., Chigorno, V., Tettamanti, G., and Sonnino, S. (2000). Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study. *J. Biol. Chem.* 275, 11658–11665.
- Pryor, S., McCaffrey, G., Young, L. R., and Grimes, M. L. (2012). NGF causes TrkA to specifically attract microtubules to lipid rafts. *PLoS One* 7, e35163.
- Pulfer, M., and Murphy, R. C. (2003). Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom. Rev.* 22, 332–364.
- Puzianowska-Kuznicka, M., and Kuznicki, J. (2005). Genetic alterations in accelerated ageing syndromes. Do they play a role in natural ageing? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 947–960.
- Quinn, J. F. *et al.* (2010). Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 304, 1903–1911.
- Rabin, S. J., Bachis, A., and Mocchetti, I. (2002). Gangliosides activate Trk receptors by inducing the release of neurotrophins. *J. Biol. Chem.* 277, 49466–49472.
- Rajendran, L., Masilamani, M., Solomon, S., Tikkanen, R., Stuermer, C. A. O., Plattner, H., and Illges, H. (2003). Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8241–8246.
- Rajendran, L., and Simons, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell Sci.* 118, 1099–1102.
- 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.
- Rauch, C., and Farge, E. (2005). Rôle de l'élasticité des membranes dans la régulation de l'expression génétique. *Images Phys.*, 251–256.
- Rawicz, W., Olbrich, K. C., McIntosh, T., Needham, D., and Evans, E. (2000). Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* 79, 328–339.
- 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.
- Reis, G. J., Silverman, D. I., Boucher, T. M., Sipperly, M. E., Horowitz, G. L., Sacks, F. M., and Pasternak, R. C. (1990). Effects of two types of fish oil supplements on serum lipids and plasma phospholipid fatty acids in coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 66, 1171–1175.
- Reitz, C. (2013). Dyslipidemia and the risk of Alzheimer's disease. *Curr. Atheroscler. Rep.* 15, 307.
- van de Rest, O., Geleijnse, J. M., Kok, F. J., van Staveren, W. A., Dullemeijer, C., Olderikkert, 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.
- Robbez Masson, V., Lucas, A., Gueugneau, A.-M., Macaire, J.-P., Paul, J.-L., Grynberg, A., and Rousseau, D. (2008). Long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids prevent metabolic and vascular disorders in fructose-fed rats. *J. Nutr.* 138, 1915–1922.
- Robert-Bobée, I. (2006). Projections de population pour la France métropolitaine à l'horizon 2050. *Insee Prem.* N°1089.
- Robertson, S. A., Leininger, G. M., and Myers, M. G. (2008). Molecular and neural mediators of leptin action. *Physiol. Behav.* 94, 637–642.
- Rockwood, K. (2005). What would make a definition of frailty successful? *Age Ageing* 34, 432–434.
- Rockwood, K., Fox, R. A., Stolee, P., Robertson, D., and Beattie, B. L. (1994). Frailty in elderly people: an evolving concept. *CMAJ Can. Med. Assoc. J.* 150, 489–495.

- Rodgers, E. E., and Theibert, A. B. (2002). Functions of PI 3-kinase in development of the nervous system. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 20, 187–197.
- Rodríguez-Asiain, A. *et al.* (2011). Brain specific kinase-1 BRSK1/SAD-B associates with lipid rafts: modulation of kinase activity by lipid environment. *Biochim. Biophys. Acta* 1811, 1124–1135.
- Rogasevskaia, T., and Coorsen, J. R. (2006). Sphingomyelin-enriched microdomains define the efficiency of native Ca(2+)-triggered membrane fusion. *J. Cell Sci.* 119, 2688–2694.
- Rose, H. G., and Oklander, M. (1965). IMPROVED PROCEDURE FOR THE EXTRACTION OF LIPIDS FROM HUMAN ERYTHROCYTES. *J. Lipid Res.* 6, 428–431.
- Rötig, A. (2004). Accumulation de mutations de l'ADN mitochondrial chez la souris : un modèle idéal de vieillissement. *MS Médecine Sci.* 20, 847–847.
- Rowe, J. W., and Kahn, R. L. (1987). Human aging: usual and successful. *Science* 237, 143–149.
- Rowe, J. W., and Kahn, R. L. (1997). Successful aging. *The Gerontologist* 37, 433–440.
- Rudge, J. S., Alderson, R. F., Pasnikowski, E., McClain, J., Ip, N. Y., and Lindsay, R. M. (1992). Expression of Ciliary Neurotrophic Factor and the Neurotrophins-Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 3-in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* 4, 459–471.
- Sable, P., Kale, A., Joshi, A., and Joshi, S. (2014). Maternal micronutrient imbalance alters gene expression of BDNF, NGF, TrkB and CREB in the offspring brain at an adult age. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 34, 24–32.
- Sahin, E., and DePinho, R. A. (2012). Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 397–404.
- Sakurai, T., Kaneko, K., Okuno, M., Wada, K., Kashiyama, T., Shimizu, H., Akagi, T., Hashikawa, T., and Nukina, N. (2008). Membrane microdomain switching: a regulatory mechanism of amyloid precursor protein processing. *J. Cell Biol.* 183, 339–352.
- Salat, D. H. *et al.* (2005). Age-related alterations in white matter microstructure measured by diffusion tensor imaging. *Neurobiol. Aging* 26, 1215–1227.
- Salaün, C., Gould, G. W., and Chamberlain, L. H. (2005). Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 280, 19449–19453.
- Sampath, H., and Ntambi, J. M. (2005). Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 317–340.
- Sango, K., Yanagisawa, H., Komuta, Y., Si, Y., and Kawano, H. (2008). Neuroprotective properties of ciliary neurotrophic factor for cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. *Histochem. Cell Biol.* 130, 669–679.
- Sanna, P. P., Cammalleri, M., Berton, F., Simpson, C., Lutjens, R., Bloom, F. E., and Francesconi, W. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 3359–3365.
- Santhakumar, A. B., Bulmer, A. C., and Singh, I. (2014). A review of the mechanisms and effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic risk. *J. Hum. Nutr. Diet. Off. J. Br. Diet. Assoc.* 27, 1–21.
- Sargiacomo, M., Scherer, P. E., Tang, Z., Kübler, E., Song, K. S., Sanders, M. C., and Lisanti, M. P. (1995). Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9407–9411.
- Sastry, P. S. (1985). Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog. Lipid Res.* 24, 69–176.
- 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.
- 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., and Mufson, E. J. (2006). Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* 27, 1372–1384.
- Scheltens, P. *et al.* (2012). Efficacy of Souvenaid in mild Alzheimer's disease: results from a randomized, controlled trial. *J. Alzheimers Dis. JAD* 31, 225–236.
- Scheltens, P., Kamphuis, P. J. G. H., Verhey, F. R. J., Olde Rikkert, M. G. M., Wurtman, R. J., Wilkinson, D., Twisk, J. W. R., and Kurz, A. (2010). Efficacy of a medical food in mild Alzheimer's disease: A randomized, controlled trial. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 6, 1–10.e1.
- Schuchardt, J. P., and Hahn, A. (2013). Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 89, 1–8.

- Schuchardt, J. P., Schneider, I., Meyer, H., Neubronner, J., von Schacky, C., and Hahn, A. (2011). Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations--a comparative bioavailability study of fish oil vs. krill oil. *Lipids Health Dis.* *10*, 145.
- Schulte-Herbrüggen, O., Eckart, S., Deicke, U., Kühl, A., Otten, U., Danker-Hopfe, H., Abramowski, D., Staufenbiel, M., and Hellweg, R. (2008a). Age-dependent time course of cerebral brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 in APP23 transgenic mice. *J. Neurosci. Res.* *86*, 2774–2783.
- Schulte-Herbrüggen, O., Jockers-Scherübl, M. C., and Hellweg, R. (2008b). Neurotrophins: from pathophysiology to treatment in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* *5*, 38–44.
- Schumann, J., Leichtle, A., Thiery, J., and Fuhrmann, H. (2011). Fatty acid and peptide profiles in plasma membrane and membrane rafts of PUFA supplemented RAW264.7 macrophages. *PLoS One* *6*, e24066.
- Sebastião, A. M., Colino-Oliveira, M., Assaife-Lopes, N., Dias, R. B., and Ribeiro, J. A. (2013). Lipid rafts, synaptic transmission and plasticity: impact in age-related neurodegenerative diseases. *Neuropharmacology* *64*, 97–107.
- Sehgal, P. B., Guo, G. G., Shah, M., Kumar, V., and Patel, K. (2002). Cytokine signaling: STATS in plasma membrane rafts. *J. Biol. Chem.* *277*, 12067–12074.
- Selhub, J., Troen, A., and Rosenberg, I. H. (2010). B vitamins and the aging brain. *Nutr. Rev.* *68 Suppl 2*, S112–S118.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* *81*, 741–766.
- Selkoe, D. J. (2008). Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav. Brain Res.* *192*, 106–113.
- Selzner, A. (2006). Nutrition des personnes âgées. Synthèse Doc. Développée Dans Cadre Programme Mieux Se Nourrir Mieux Vivre Quand Av. En Âge.
- Serhan, C. N., Chiang, N., and Van Dyke, T. E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 349–361.
- Sessler, A. M., and Ntambi, J. M. (1998). Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J. Nutr.* *128*, 923–926.
- Shaikh, S. R., and Teague, H. (2012). N-3 fatty acids and membrane microdomains: from model membranes to lymphocyte function. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *87*, 205–208.
- 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.
- Shcheglova, T., Makker, S. P., and Tramontano, A. (2009). Covalent Binding Antibodies Suppress Advanced Glycation: On the Innate Tier of Adaptive Immunity. *Acta Naturae* *1*, 66–72.
- Shepardson, N. E., Shankar, G. M., and Selkoe, D. J. (2011). Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: II. Review of human trials and recommendations. *Arch. Neurol.* *68*, 1385–1392.
- Shi, S.-S., Shao, S.-H., Yuan, B.-P., Pan, F., and Li, Z.-L. (2010). Acute stress and chronic stress change brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase-coupled receptor (TrkB) expression in both young and aged rat hippocampus. *Yonsei Med. J.* *51*, 661–671.
- Shi, Y., and Burn, P. (2004). Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nat. Rev. Drug Discov.* *3*, 695–710.
- Simonsen, A., Cumming, R. C., Brech, A., Isakson, P., Schubert, D. R., and Finley, K. D. (2008). Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy* *4*, 176–184.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* *387*, 569–572.
- Simons, K., and Sampaio, J. L. (2011). Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a004697.
- Simopoulos, A. P., Leaf, A., and Salem, N. (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.
- Simpson, S. J., and Raubenheimer, D. (2007). Caloric restriction and aging revisited: the need for a geometric analysis of the nutritional bases of aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* *62*, 707–713.
- Simpson, S. J., and Raubenheimer, D. (2009). Macronutrient balance and lifespan. *Aging* *1*, 875–880.
- Skully, R. (2014). Essential nutrient requirements of the elderly. *Nutr. Diet. Suppl.*, 59–68.
- Slee, E. L., McLennan, P. L., Owen, A. J., and Theiss, M. L. (2010). Low dietary fish-oil threshold for myocardial membrane n-3 PUFA enrichment independent of n-6 PUFA intake in rats. *J. Lipid Res.* *51*, 1841–1848.
- Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T., and Lisanti, M. P. (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 7289–7304.
- Snigdha, S., Astarita, G., Piomelli, D., and Cotman, C. W. (2012). Effects of diet and behavioral enrichment on free fatty acids in the aged canine brain. *Neuroscience* *202*, 326–333.
- Söderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K., and Dallner, G. (1990). Lipid compositions of different regions of the human brain during aging. *J. Neurochem.* *54*, 415–423.

- Sodero, A. O., Trovò, L., Iannilli, F., Van Veldhoven, P., Dotti, C. G., and Martin, M. G. (2011a). Regulation of tyrosine kinase B activity by the Cyp46/cholesterol loss pathway in mature hippocampal neurons: relevance for neuronal survival under stress and in aging. *J. Neurochem.* *116*, 747–755.
- Sodero, A. O., Weissmann, C., Ledesma, M. D., and Dotti, C. G. (2011b). Cellular stress from excitatory neurotransmission contributes to cholesterol loss in hippocampal neurons aging in vitro. *Neurobiol. Aging* *32*, 1043–1053.
- Soilu-Hänninen, M., Broberg, E., Røyttä, M., Mattila, P., Rinne, J., and Hukkanen, V. (2010). Expression of LIF and LIF receptor beta in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Acta Neurol. Scand.* *121*, 44–50.
- Solfrizzi, V. *et al.* (2011). Mediterranean diet in predementia and dementia syndromes. *Curr. Alzheimer Res.* *8*, 520–542.
- Solfrizzi, V., Frisardi, V., Capurso, C., D'Introno, A., Colacicco, A. M., Vendemiale, G., Capurso, A., and Panza, F. (2010). Dietary fatty acids in dementia and predementia syndromes: epidemiological evidence and possible underlying mechanisms. *Ageing Res. Rev.* *9*, 184–199.
- Song, J., Wu, L., Chen, Z., Kohanski, R. A., and Pick, L. (2003). Axons guided by insulin receptor in *Drosophila* visual system. *Science* *300*, 502–505.
- Sonnino, S., Aureli, M., Grassi, S., Mauri, L., Prioni, S., and Prinetti, A. (2013). Lipid Rafts in Neurodegeneration and Neuroprotection. *Mol. Neurobiol.*
- Sonnino, S., and Chigorno, V. (2000). Ganglioside molecular species containing C18- and C20-sphingosine in mammalian nervous tissues and neuronal cell cultures. *Biochim. Biophys. Acta* *1469*, 63–77.
- Sonnino, S., Mauri, L., Chigorno, V., and Prinetti, A. (2007). Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology* *17*, 1R – 13R.
- Sosa-Ortiz, A. L., Acosta-Castillo, I., and Prince, M. J. (2012). Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease. *Arch. Med. Res.* *43*, 600–608.
- 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. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 836–838.
- Sprong, H., van der Sluijs, P., and van Meer, G. (2001). How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 504–513.
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 206–221.
- Stary, C. M., Tsutsumi, Y. M., Patel, P. M., Head, B. P., Patel, H. H., and Roth, D. M. (2012). Caveolins: targeting pro-survival signaling in the heart and brain. *Front. Physiol.* *3*, 393.
- Steinberg, G. R., Watt, M. J., Ernst, M., Birnbaum, M. J., Kemp, B. E., and Jørgensen, S. B. (2009). Ciliary neurotrophic factor stimulates muscle glucose uptake by a PI3-kinase-dependent pathway that is impaired with obesity. *Diabetes* *58*, 829–839.
- Stern, Y. (2002). What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. *J. Int. Neuropsychol. Soc. JINS* *8*, 448–460.
- Stewart, J., Mitchell, J., and Kalant, N. (1989). The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes. *Neurobiol. Aging* *10*, 669–675.
- Stillwell, W., and Wassall, S. R. (2003). Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem. Phys. Lipids* *126*, 1–27.
- Stinson, A. M., Wiegand, R. D., and Anderson, R. E. (1991). Recycling of docosahexaenoic acid in rat retinas during n-3 fatty acid deficiency. *J. Lipid Res.* *32*, 2009–2017.
- Strawbridge, W. J., Wallhagen, M. I., and Cohen, R. D. (2002). Successful aging and well-being: self-rated compared with Rowe and Kahn. *The Gerontologist* *42*, 727–733.
- Stuermer, C. A., Lang, D. M., Kirsch, F., Wiechers, M., Deininger, S. O., and Plattner, H. (2001). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2. *Mol. Biol. Cell* *12*, 3031–3045.
- Stuermer, C. A. O. (2011). Microdomain-forming proteins and the role of the reggies/flotillins during axon regeneration in zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta* *1812*, 415–422.
- Suzuki, S., Numakawa, T., Shimazu, K., Koshimizu, H., Hara, T., Hatanaka, H., Mei, L., Lu, B., and Kojima, M. (2004). BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: roles in synaptic modulation. *J. Cell Biol.* *167*, 1205–1215.
- Suzuki, S., Tanaka, K., and Suzuki, N. (2009). Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *29*, 464–479.
- Suzuki, T., Zhang, J., Miyazawa, S., Liu, Q., Farzan, M. R., and Yao, W.-D. (2011). Association of membrane rafts and postsynaptic density: proteomics, biochemical, and ultrastructural analyses. *J. Neurochem.* *119*, 64–77.
- Svennerholm, L., Boström, K., Jungbjer, B., and Olsson, L. (1994). Membrane lipids of adult human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years. *J. Neurochem.* *63*, 1802–1811.
- Swindell, W. R. (2009). Genes and gene expression modules associated with caloric restriction and aging in the laboratory mouse. *BMC Genomics* *10*, 585.

- Szoke, E., Shrayyef, M. Z., Messing, S., Woerle, H. J., van Haefen, T. W., Meyer, C., Mitrakou, A., Pimenta, W., and Gerich, J. E. (2008). Effect of Aging on Glucose Homeostasis Accelerated deterioration of β -cell function in individuals with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 31, 539–543.
- Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998). Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4109–4117.
- Takedo, A., Yasuda, T., Miyata, T., Mizuno, K., Li, M., Yoneyama, S., Horie, K., Maeda, K., and Sobue, G. (1996). Immunohistochemical study of advanced glycation end products in aging and Alzheimer's disease brain. *Neurosci. Lett.* 221, 17–20.
- Tang, B. L. (2008). Leptin as a neuroprotective agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368, 181–185.
- 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 Health Dis.* 11, 70.
- Terracina, L., Brunetti, M., Avellini, L., De Medio, G. E., Trovarelli, G., and Gaiti, A. (1992). Linoleic acid metabolism in brain cortex of aged rats. *Ital. J. Biochem.* 41, 225–235.
- Terry, A. V., Kutiyawalla, A., and Pillai, A. (2011). Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats. *Physiol. Behav.* 102, 149–157.
- Tessier, F. J. (2010). The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol. Biol. (Paris)* 58, 214–219.
- Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M., and van Deurs, B. (2002). Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol. Biol. Cell* 13, 238–250.
- Torres, M. *et al.* (2013). Membrane lipid modifications and therapeutic effects mediated by hydroxydocosahexaenoic acid on Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Touyarot, K., Bonhomme, D., Roux, P., Alfos, S., Lafenêtre, P., Richard, E., Higuieret, P., and Pallet, V. (2013). A mid-life vitamin A supplementation prevents age-related spatial memory deficits and hippocampal neurogenesis alterations through CRABP-I. *PLoS One* 8, e72101.
- Trifunovic, A. *et al.* (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417–423.
- Tripathy, D., Yin, X., Sanchez, A., Luo, J., Martinez, J., and Grammas, P. (2010). Cerebrovascular expression of proteins related to inflammation, oxidative stress and neurotoxicity is altered with aging. *J. Neuroinflammation* 7, 63.
- Trivalle, C. (2004). Vieillesse normale : mythe ou réalité? *Rev. Prat. Médecine Générale*, 1263–1266.
- Trovò, L., Van Veldhoven, P. P., Martín, M. G., and Dotti, C. G. (2011). Sphingomyelin upregulation in mature neurons contributes to TrkB activity by Rac1 endocytosis. *J. Cell Sci.* 124, 1308–1315.
- Tsuda, M., Kitazaki, T., and Imai, Y. (1983). Changes in the profiles of rodent plasma lipoproteins and apolipoproteins after cholesterol feeding. *J. Biochem. (Tokyo)* 93, 1071–1077.
- Tucker, A. M., and Stern, Y. (2011). COGNITIVE RESERVE IN AGING. *Curr. Alzheimer Res.* 8, 354–360.
- Tu, H., Hsueh, H., Kastin, A. J., Wu, X., and Pan, W. (2010). Unique leptin trafficking by a tailless receptor. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24, 2281–2291.
- Turner, N., Else, P. L., and Hulbert, A. J. (2003). Docosahexaenoic acid (DHA) content of membranes determines molecular activity of the sodium pump: implications for disease states and metabolism. *Naturwissenschaften* 90, 521–523.
- Tu, W. C., Mühlhäusler, B. S., Yelland, L. N., and Gibson, R. A. (2013). Correlations between blood and tissue omega-3 LCPUFA status following dietary ALA intervention in rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 88, 53–60.
- Twiss, J. L., Chang, J. H., and Schanen, N. C. (2006). Pathophysiological mechanisms for actions of the neurotrophins. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 16, 320–332.
- Uauy, R., and Dangour, A. D. (2006). Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. *Nutr. Rev.* 64, S24–S33; discussion S72–S91.
- 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.
- Ulven, S. M., Kirkhus, B., Lamglait, A., Basu, S., Elind, E., Haider, T., Berge, K., Vik, H., and Pedersen, J. I. (2011). Metabolic effects of krill oil are essentially similar to those of fish oil but at lower dose of EPA and DHA, in healthy volunteers. *Lipids* 46, 37–46.
- Uranga, R. M., Bruce-Keller, A. J., Morrison, C. D., Fernandez-Kim, S. O., Ebenezer, P. J., Zhang, L., Dasuri, K., and Keller, J. N. (2010). Intersection between metabolic dysfunction, high fat diet consumption, and brain aging. *J. Neurochem.* 114, 344–361.
- Ureshino, R. P., Rocha, K. K., Lopes, G. S., Bincoletto, C., and Smaili, S. S. (2014). Calcium Signaling Alterations, Oxidative Stress, and Autophagy in Aging. *Antioxid. Redox Signal.*
- Vainio, S., Heino, S., Mansson, J.-E., Fredman, P., Kuismanen, E., Vaarala, O., and Ikonen, E. (2002). Dynamic association of human insulin receptor with lipid rafts in cells lacking caveolae. *EMBO Rep.* 3, 95–100.

- Vandenbossche, J., Coomans, D., Homblé, K., and Deroost, N. (2014). The effect of cognitive aging on implicit sequence learning and dual tasking. *Front. Psychol.* *5*, 154.
- VanGuilder, H. D., Yan, H., Farley, J. A., Sonntag, W. E., and Freeman, W. M. (2010). Aging alters the expression of neurotransmission-regulating proteins in the hippocampal synaptome. *J. Neurochem.* *113*, 1577–1588.
- Vetrivel, K. S., and Thinakaran, G. (2010). Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochim. Biophys. Acta* *1801*, 860–867.
- Volinsky, R., and Kinnunen, P. K. J. (2013). Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology. *FEBS J.* *280*, 2806–2816.
- Wang, K., Zhou, F., Zhu, L., Zhu, X., Zhang, K., and Zhu, L. (2014). High level soluble expression, purification, and characterization of human ciliary neurotrophic factor in *Escherichia coli* by single protein production system. *Protein Expr. Purif.* *96*, 8–13.
- Wang, T.-M., Hsieh, S.-C., Chen, J.-W., and Chiang, A.-N. (2013). Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid reduce C-reactive protein expression and STAT3 activation in IL-6-treated HepG2 cells. *Mol. Cell. Biochem.* *377*, 97–106.
- Wan, J., Fu, A. K. Y., Ip, F. C. F., Ng, H.-K., Hugon, J., Page, G., Wang, J. H., Lai, K.-O., Wu, Z., and Ip, N. Y. (2010). Tyk2/STAT3 signaling mediates beta-amyloid-induced neuronal cell death: implications in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 6873–6881.
- Waring, J. D., Addis, D. R., and Kensinger, E. A. (2013). Effects of aging on neural connectivity underlying selective memory for emotional scenes. *Neurobiol. Aging* *34*, 451–467.
- 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.
- Whitmer, R. A. (2007). The epidemiology of adiposity and dementia. *Curr. Alzheimer Res.* *4*, 117–122.
- Williams, C. M., and Burdge, G. (2006). Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. *Proc. Nutr. Soc.* *65*, 42–50.
- Williamson, R., McNeilly, A., and Sutherland, C. (2012). Insulin resistance in the brain: an old-age or new-age problem? *Biochem. Pharmacol.* *84*, 737–745.
- Williams, W. M., and Chung, Y. W. (2006). Evidence for an age-related attenuation of cerebral microvascular antioxidant response to oxidative stress. *Life Sci.* *79*, 1638–1644.
- 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., Russeau, 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.
- Wu, J. H. Y., Lemaitre, R. N., King, I. B., Song, X., Sacks, F. M., Rimm, E. B., Heckbert, S. R., Siscovick, D. S., and Mozaffarian, D. (2012). Association of plasma phospholipid long-chain ω -3 fatty acids with incident atrial fibrillation in older adults: the cardiovascular health study. *Circulation* *125*, 1084–1093.
- Xi, H., Li, C., Ren, F., Zhang, H., and Zhang, L. (2013). Telomere, aging and age-related diseases. *Aging Clin. Exp. Res.* *25*, 139–146.
- Xiong, H. *et al.* (2008). Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and A β production. *Neurobiol. Dis.* *29*, 422–437.
- Xu, X., and Sonntag, W. E. (1996). Growth hormone-induced nuclear translocation of Stat-3 decreases with age: modulation by caloric restriction. *Am. J. Physiol.* *271*, E903–E909.
- Yamada-Goto, N., Katsuura, G., Ochi, Y., Ebihara, K., Kusakabe, T., Hosoda, K., and Nakao, K. (2012). Impairment of fear-conditioning responses and changes of brain neurotrophic factors in diet-induced obese mice. *J. Neuroendocrinol.* *24*, 1120–1125.
- Yamada, K., Nitta, A., Saito, T., Hu, J., and Nabeshima, T. (1995). Changes in ciliary neurotrophic factor content in the rat brain after continuous intracerebroventricular infusion of beta-amyloid(1-40) protein. *Neurosci. Lett.* *201*, 155–158.
- Yamaguchi, A., Tamatani, M., Matsuzaki, H., Namikawa, K., Kiyama, H., Vitek, M. P., Mitsuda, N., and Tohyama, M. (2001). Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. *J. Biol. Chem.* *276*, 5256–5264.
- Yamamoto, N., Matsubara, T., Sato, T., and Yanagisawa, K. (2008). Age-dependent high-density clustering of GM1 ganglioside at presynaptic neuritic terminals promotes amyloid beta-protein fibrillogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 2717–2726.
- Yanai, S., Okaichi, Y., and Okaichi, H. (2004). Long-term dietary restriction causes negative effects on cognitive functions in rats. *Neurobiol. Aging* *25*, 325–332.
- Yang, L. Y., Kuksis, A., and Myher, J. J. (1990). Intestinal absorption of menhaden and rapeseed oils and their fatty acid methyl and ethyl esters in the rat. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* *68*, 480–491.
- Yang, S. H., Qiao, X., Fong, L. G., and Young, S. G. (2008). Treatment with a farnesyltransferase inhibitor improves survival in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Biochim. Biophys. Acta* *1781*, 36–39.

- Yang, T.-T., Hsu, C.-T., and Kuo, Y.-M. (2009). Cell-derived soluble oligomers of human amyloid-beta peptides disturb cellular homeostasis and induce apoptosis in primary hippocampal neurons. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 *116*, 1561–1569.
- Yaqoob, P., and Shaikh, S. R. (2010). The nutritional and clinical significance of lipid rafts. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *13*, 156–166.
- Yates, F. E. (2002). Complexity of a human being: changes with age. *Neurobiol. Aging* *23*, 17–19.
- 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.
- Yetimler, B., Ulusoy, G., Çelik, T., and Jakubowska-Doğru, E. (2012). Differential effect of age on the brain fatty acid levels and their correlation with animal cognitive status in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *103*, 53–59.
- 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- β oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiol. Aging* *29*, 1319–1333.
- Yu, J., Wjasow, C., and Backer, J. M. (1998). Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J. Biol. Chem.* *273*, 30199–30203.
- Yurko-Mauro, K. (2010). Cognitive and cardiovascular benefits of docosahexaenoic acid in aging and cognitive decline. *Curr. Alzheimer Res.* *7*, 190–196.
- Yurko-Mauro, K., McCarthy, D., Rom, D., Nelson, E. B., Ryan, A. S., Blackwell, A., Salem, N., Stedman, M., and MIDAS Investigators (2010a). Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* *6*, 456–464.
- Yurko-Mauro, K., McCarthy, D., Rom, D., Nelson, E. B., Ryan, A. S., Blackwell, A., Salem, N., Stedman, M., and MIDAS Investigators (2010b). Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* *6*, 456–464.
- Zamboni, M., Mazzali, G., Zoico, E., Harris, T. B., Meigs, J. B., Di Francesco, V., Fantin, F., Bissoli, L., and Bosello, O. (2005). Health consequences of obesity in the elderly: a review of four unresolved questions. *Int. J. Obes.* 2005 *29*, 1011–1029.
- Zamboni, M., Rossi, A. P., Fantin, F., Zamboni, G., Chirumbolo, S., Zoico, E., and Mazzali, G. (2013). Adipose tissue, diet and aging. *Mech. Ageing Dev.*
- Zemva, J., and Schubert, M. (2014). The role of neuronal insulin/insulin-like growth factor-1 signaling for the pathogenesis of Alzheimer's disease: possible therapeutic implications. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* *13*, 322–337.
- Zhang, Y., Appelkvist, E. L., Kristensson, K., and Dallner, G. (1996). The lipid compositions of different regions of rat brain during development and aging. *Neurobiol. Aging* *17*, 869–875.
- Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., and Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Mol. Brain* *4*, 3.
- Zimmer, L., Delion-Vancassel, S., Durand, G., Guilloateau, 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.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

- **Publications**

INCREASED SUSCEPTIBILITY OF DYSLIPIDEMIC LSR+/- MICE TO AMYLOID STRESS IS ASSOCIATED WITH CHANGES IN CORTICAL CHOLESTEROL LEVELS.

Pinçon A, Thomas MH, Huguet M, Allouche A, **Colin JC**, Georges A, Derrien A, Lanhers MC, Malaplate-Armand C, Oster T, Corbier C, Pillot T, Olivier JL, Yen FT. *J Alzheimer Dis.* 2015 ; 45 (1) : 195-204.

CONTROL OF INTRACELLULAR LEVELS OF FREE ARACHIDONIC ACID: A TARGET IN THERAPEUTIC OR PREVENTICE STRATEGIES AGAINST ALZHEIMER'S DISEASE?

Thomas M, Pelleieux S, Allouche A, **Colin J**, Oster T, Malaplate-Armand C, Olivier JL. In: *Arachidonic Acid: Sources, Biosynthesis and Health Effects.* 2014. Ed. Jason M. O'Keefe, Nova Science Publ.

- **Communications orales**

Collège National de Biochimie-Biologie moléculaire médicale, 5 septembre 2014, ANGERS, France.

EFFETS PRO-VIEILLISSEMENT D'UN RÉGIME HYPERIPIDIQUE SUR LA FONCTIONNALITÉ D'UNE CIBLE THÉRAPEUTIQUE NEURONALE D'INTÉRÊT DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER.

Julie Colin, Alexandra Clément, Marion Huguet, Annabelle Derrien, Frances Yen-Potin, Thierry Oster, Catherine Malaplate-Armand.

Séminaire de l'école doctorale RP2E, 16 Janvier 2014, NANCY, France.

IMPORTANCE DES LIPIDES SUR LA FONCTIONNALITÉ DE CIBLES PROTÉIQUES DANS LE CERVEAU : INTÉRÊT D'UNE SUPPLÉMENTATION EN DHA.

Julie Colin, Annabelle Derrien, Ahmad Allouche, Marion Huguet, Mélanie Thomas, Frances Yen Potin, Thierry Oster, Catherine Malaplate-Armand.

Journées francophones de nutrition, 11 Décembre 2013, BORDEAUX, France.

EFFETS PRO-VIEILLISSEMENT D'UN RÉGIME HYPERLIPIDIQUE SUR LA FONCTIONNALITÉ D'UNE CIBLE THÉRAPEUTIQUE NEURONALE D'INTÉRÊT DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER.

Catherine Malaplate-Armand, **Julie Colin**, Ahmad Allouche, Annabelle Derrien, Alexandra Clément, Marion Huguet, Frances Yen-Potin, Thierry Oster.

- **Communications affichées**

Journées thématiques de la société des neurosciences, 19 et 20 mai 2014, LILLE, France.

INCREASED SUSCEPTIBILITY OF DYSLIPIDEMIC LSR+/- MICE TO AMYLOID STRESS.

Anthony Pinçon, Ahmad Allouche, Annabelle Derrien, Marie-Claire Lanhers, Mélanie H. Thomas, **Julie Colin**, Catherine Malaplate-Armand, Thierry Oster, Jean Luc Olivier, Frances Yen Potin.

Séminaire de l'école doctorale RP2E, 16 Janvier 2014, NANCY, France.

ÉVALUATION D'UNE APPROCHE NUTRITIONNELLE PRÉVENTIVE DU VIEILLISSEMENT CÉRÉBRAL.

Julie Colin, Annabelle Derrien, Ahmad Allouche, Marion Huguet, Mélanie Thomas, Frances Yen Potin, Thierry Oster, Catherine Malaplate-Armand.

9^{ème} Congrès de Lipidomique (GERLI), 17-19 Octobre 2012, PARIS, France.

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.

9^{ème} Congrès de Lipidomique (GERLI), 17-19 Octobre 2012, PARIS, France.

LEPTIN REGULATIONS OF BACE-1, CYTOSOLIC PHOSPHOLIPASE A₂ AND CYCLOOXYGENASES IN CULTURED FIBROBLASTS FROM ALZHEIMER PATIENTS AND NORMAL SUBJECTS.

Annabelle Derrien, **Julie Colin**, Dorine Rimet, Thierry Pillot, Thierry Oster, Frances Yen Potin, Mathilde Sauvée, Christine Perret-Guillaume, Catherine Malaplate-Armand, Jean-Luc Olivier.

RÉSUMÉ – ABSTRACT

Résumé. L'un des phénomènes sociétaux marquants de ces dernières dizaines d'années est le vieillissement de la population lié à l'allongement régulier de la durée de vie et en conséquence, une augmentation considérable du nombre et de la proportion de personnes âgées, notamment dans nos pays occidentaux. Dans ce contexte démographique, la recrudescence des pathologies chroniques liées au vieillissement, dont la maladie d'Alzheimer et les autres types de démences, sont devenues un enjeu majeur de santé publique. L'impact de nombreux facteurs environnementaux modulables, l'aspect chronique et évolutif des mécanismes pathogènes mis en jeu, et parfois même l'absence de traitements curatifs, doivent largement inciter à développer des interventions préventives permettant de minimiser les risques de développer ces maladies liées au vieillissement. Ce travail nous a permis dans un premier temps de mettre en évidence l'importance d'utiliser des modèles d'étude et des modes d'expérimentation adaptés au vieillissement pour espérer en ralentir ou retarder les processus délétères. Dans un second temps, nos résultats ont permis d'identifier les membranes comme des éléments essentiels au bon fonctionnement cérébral. L'altération de la composition et de l'architecture des membranes neuronales chez la souris âgée perturbe leurs fonctionnalités et diminue les capacités de réponse neuroprotectrices recherchées lors des thérapies anti-Alzheimer par exemple. Nous avons aussi observé des modifications membranaires comparables chez les souris rendues dyslipidémiques par un régime alimentaire excessif en lipides saturés et en cholestérol auquel nous avons pu clairement attribuer un rôle pro-vieillescence. Les perturbations de l'homéostasie lipidique sont donc corrélées à un risque accru de survenue de pathologies liées au vieillissement, cardiovasculaires et métaboliques autant que neurodégénératives. Nous avons finalement démontré le potentiel préventif d'une supplémentation alimentaire en acide docosahexaénoïque (C22:6, *n*-3), l'acide gras polyinsaturé (AGPI) à longue chaîne majoritaire dans le cerveau, et pu conclure en sa capacité de restaurer une réponse neuroprotectrice altérée chez la souris âgée. Les résultats de notre étude valident donc l'intérêt fonctionnel de combiner aux traitements pharmacologiques des approches nutritionnelles préventives et adjuvantes à base d'AGPI *n*-3 permettant de préserver la réactivité et la faculté de réponse des membranes neuronales des sujets âgés, afin de limiter le vieillissement cérébral et d'optimiser l'efficacité des molécules et approches thérapeutiques anti-Alzheimer.

Mots clés. Acide docosahexaénoïque, acides gras polyinsaturés *n*-3, dyslipidémies, maladie d'Alzheimer, membrane neuronale, neuroprotection fonctionnelle, nutrition, prévention, rafts lipidiques, vieillissement.

Abstract. One of the marked societal phenomena in recent decades is the aging of populations due to continually increasing lifespans and as a result, a considerable surge in the number and proportion of elderly, particularly in Western countries. In this demographic context, the rise of chronic diseases related to aging, including Alzheimer's disease and other types of dementia, has become a major public health issue. The impact of modifiable environmental factors, evolution of the pathogenic mechanisms involved, and the lack of curative treatments illustrates the need for the development of interventions to prevent or delay the onset of these aging-related diseases. The present work demonstrates the importance of using age-adapted study models and experimental methods with the goal towards slowing or delaying age-related deleterious processes. Secondly, our results have identified membranes as an essential part for normal brain function. The composition and architectural changes in the neuronal membranes of elderly mice disrupt their functionality and reduce neuroprotective responsiveness such as those sought by anti-Alzheimer's therapies. We also observed similar pro-aging-type changes in brain membranes of dyslipidemic mice fed a high-fat diet. Thus, disturbances of lipid homeostasis are correlated with an increased risk of developing aging-related cardiovascular and metabolic as well as neurodegenerative diseases. We finally demonstrated the preventive potential of dietary supplementation with docosahexaenoic acid (C22:6, *n*-3), the most abundant long-chain polyunsaturated fatty acid in the brain, and observed its ability to restore a neuroprotective response that was impaired in older mice. The results of our study validate the functional interest of combining pharmacological treatments and preventive nutritional approaches based on *n*-3 polyunsaturated fatty acids to preserve neuronal membrane responsiveness in the elderly, with the goal towards minimizing brain aging and optimizing the efficiency of anti-Alzheimer's therapeutic molecules and approaches.

Keywords. Aging, Alzheimer's disease, docosahexaenoic acid, dyslipidemia, functional neuroprotection, lipid rafts, neuronal membrane, nutrition, polyunsaturated fatty acids *n*-3, prevention.