HAL
open science

Impact of dietary arachidonic acid intake on the gut microbiota and the gut-brain axis. Consequences for prevention of Alzheimer's disease by probiotics

Katleen Pinchaud

To cite this version:

Katleen Pinchaud. Impact of dietary arachidonic acid intake on the gut microbiota and the gut-brain axis. Consequences for prevention of Alzheimer's disease by probiotics. Food and Nutrition. Université de Lorraine, 2021. English. NNT : 2021LORR0190 . tel-03632777

HAL Id: tel-03632777

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03632777v1

Submitted on 2 Nov 2022

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

Ecole Doctorale SIReNa (Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles)
Laboratoire Calbinotox (Composés Alimentaires Biofonctionnalités et Risques Neurotoxiques)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences agronomiques, biotechnologies agro-alimentaires »

par **Katleen PINCHAUD**

Sous la direction du Pr. Jean-Luc OLIVIER

Impact d'un apport alimentaire en acide arachidonique sur le microbiote intestinal et l'axe intestin-cerveau. Conséquences pour une prévention de la maladie d'Alzheimer par les probiotiques.

Le 28 octobre 2021

Membres du jury :

Directeur de thèse :	**Mr Jean-Luc OLIVIER**	**Professeur, Calbinotox EA 7488, Vandoeuvre-Lès-Nancy**
Président de jury :	**Mme Sandrine BOSCHI-MULLER**	**Professeur, IMoPA UMR CNRS 7365, Vandoeuvre-Lès-Nancy**
Rapporteurs :	**Mr Jean-Denis TROADEC**	**Professeur, LNC UMR 7291, Aix-Marseille**
	Mr Philippe LANGELLA	**Directeur de recherche, MICALIS UMR INRAE 1319, Jouy-en-Josas**
Examinateurs :	**Mme Khadija EL-HADRI ZEGOUAGH**	**Professeur, UMR 8256 - Adaptation Biologique et Vieillissement, Paris**
	Mr Nicolas VITALE	**Directeur de recherche, INCI UPR-3212 CNRS, Strasbourg**
	Mme Sandra KAMINSKI	**Maître de conférences, SIMPA UR 7300, Vandoeuvre-Lès-Nancy**
	Mme Katy MAGUIN-GATE	**Maître de conférences, Calbinotox EA 7488, Vandoeuvre-Lès-Nancy**

Remerciements

Que dire à part, merci à tous ! A toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Je souhaite en premier lieu remercier Mr. **Langella**, Directeur de recherche à l'INRAE de Jouy-en Josas et Mr. **Jean-Denis Troadec**, Professeur des Universités de l'Université d'Aix Marseille pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je souhaite également remercier Mme. **Boschi**, Professeure des Universités à l'Université de Lorraine, Mme. **EL-Hadri Zegouagh**, Professeure des Universités à la Sorbonne Université, Mr. **Vitale**, Directeur de Recherche à l'INSERM de Strasbourg et Mmes **Kaminski** et **Maguin-Gaté**, Maitres de Conférences à l'Université de Lorraine pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Je tiens également à remercier le Professeur des Universités **Jean-Luc Olivier** et la Docteure **Katy Maguin-Gaté** qui m'ont donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse au sein du laboratoire Calbinotox. Cette thèse fut difficile et mouvementée, mais je suis ravie d'avoir pu finaliser ce travail de thèse avec vous.

J'adresse également mes remerciements aux personnes m'ayant accompagnée lors de mes différentes expériences en enseignement, de m'avoir offert ces opportunités qui m'ont beaucoup appris. Je remercie bien évidemment la Professeure **Annie Dary-Mourot** pour m'avoir permis de continuer en 4ème année de thèse sur d'autres sources de financement, la Docteure **Nathalie Grova** (non pas seulement pour l'enseignement mais également pour sa bonne humeur et nos appels donnant du baume au cœur), la Docteure **Yvonne Roussel** pour toute son aide et sa bienveillance, et tous mes autres collègues, **Eleonore**, **François**, **Franck**, **Jean-Marc** et **Nadine**. Merci à tous, ces expériences ont été très formatrices sur le plan personnel et professionnel.

Je souhaite aussi remercier toutes les personnes qui nous ont apporté leur aide tout au long de ce projet, que ce soit par prêt de matériel, au travers de mes formations ou des différents conseils que l'on a pu m'apporter. Je tiens donc à remercier chaleureusement le Directeur de recherche **Jean-Marc Chatel** qui m'a offert la possibilité de me former à différentes techniques, de rencontrer des personnes bienveillantes et très enrichissantes. J'ai énormément apprécié mes passages à Micalis. Un grand merci aussi à **Sead Chadi** pour avoir pris de son temps afin de me former à la technique d'extraction d'ADNg ainsi que d'avoir réalisé la suite

des expérimentations. Je remercie également **Sandrine Auger** pour nous avoir analyser l'ensemble des données du microbiote, avoir pris de son temps pour nous avoir aiguillés (avec **Jean-Marc Chatel**) et avoir refait plusieurs fois les analyses. Je souhaite aussi remercier **Michel Linder** pour les dosages des acides gras réalisés dans les huiles et nourritures des souris. Un grand merci à tout le 9ème étage pour m'avoir formée aux Western-Blot et nous avoir permis de réaliser nos révélations chez vous. Je tiens surtout à remercier **Vanessa** pour sa bonne humeur et son aide tout au long de ma formation Western-Blot et même après. Un grand merci également à **Jean-Michel Girardet** et **Emilie Pio** qui nous ont permis d'avoir accès à la plateforme pour réaliser nos qPCR et étaient toujours disponibles lorsque je rencontrais des problèmes techniques. Merci également à **Christian Mustin** et **Thierry Beguiristain** qui nous ont permis de broyer nos échantillons et d'observer nos coupes de cerveau au microscope à fluorescence.

J'aimerais aussi mettre en avant l'importance du soutien financier de ce projet de thèse apporté par l'**Association France Alzheimer** et la **région Grand Est**, sans qui rien n'aurait été possible.

Je souhaite ensuite remercier l'ensemble de mes collègues du laboratoire Calbinotox, qui ont participé à l'ambiance générale du laboratoire et m'ont laissé de jolis souvenirs. Merci à **Simon**, **Estefania**, **Rania** et **Chloé** pour leur bonne humeur et leur aide durant ces 4 ans de thèse. En espérant que Rania emboite le pas de la soutenance rapidement, avec des résultats à couper le souffle ! Merci à **Aline**, **Chantal**, **Justine**, **Ségolène** et **Florent** pour votre aide technique toutes ces années. Vous avez participé à la réalisation de ces résultats et je vous en remercie ! Merci tout particulièrement à **Thierry** qui m'a appris énormément de choses en peu de temps, travailler avec toi fut plus qu'agréable et enrichissant ! Merci également à **Zeeshan** pour sa formation en bactériologie, son aide fut précieuse dans ce projet de thèse. Je remercie aussi mes autres collègues que je n'ai pas cité auparavant **Magali**, **Laurent**, **Henri**, **Pascaline**, **Clarisse**, **Christophe** qui ont participé de près ou de loin à ce projet de thèse par des conseils ou par l'installation de l'ambiance au labo.

Je tiens également à remercier mes amis : Les **M&Ms**, merci à vous pour toute votre aide durant cette thèse. Je pense à nos sessions d'escalade, aux Skyperos qui m'ont tellement apporté lors des différents confinements et aux soirées ou après-midi filles tellement ressourçantes !

Florent, merci à toi aussi pour l'escalade, les skyperos, le rhum dans les crêpes et !! Bien entendu pour ces sessions de danse et de musique en salle de bactériologie lors de nos

préparations de culots bactériens (« *La cucaracha* », « *Message in a bottle* », « *Sending out an SOS* », la liste est longue…) ou encore lors des étalements ou préparation des 1600 boîtes de Pétri !!! On s'en souviendra longtemps… ! (Et je ne parle évidemment pas de notre grande descente, ni d'Yzma et de Kronk, ni du gouda…).

Merci aussi à vous **Emilie** et **Louise** du labo d'en dessous ! Merci pour votre bonne humeur, votre aide, les soirées passées ensemble et Louise, nos sessions de marche durant les confinements !! Un grand bol d'air frais !

A mon **Floflo** !! Bien que nous nous soyons rapprochés que récemment, je suis extrêmement heureuse de t'avoir rencontré ! Nos après-midis goûter avec **O'Maley** (et **Chacha** lors de ses passages) qui m'ont donné du baume au cœur lors de ma rédaction. Je n'oublierai jamais tout cela, tu as été un pilier durant cette dernière année, merci à toi !

A **Chacha** ou mam'selle, que dire de plus à part que j'ai rencontré une très belle personne, mon alter-ego de manip ! Ces deux années passées avec toi… le fait de m'avoir appris à aimer la biomol (ce qui n'était pas gagné), ce séjour passé à Lyon… Pour tout cela, je te dis un grand merci !! Merci aussi d'avoir été mon pilier durant presque 2 ans ! Merci pour ton aide pour les manips, les enseignements et tout le reste !! Malgré la distance nous restons très proches avec nos Skypes réguliers et j'attends avec impatience de pouvoir prendre l'avion un jour en ta compagnie. Merci aussi à ton **Pschitt-Pschitt**, on retiendra une leçon essentielle de ce séjour à Lyon : les plumes et les grelots, c'est la vie !

Un grand merci aussi à ma chère **Annanette** qui, même à distance a su être présente et me soutenir !!!! Malgré les obstacles, tu as réussi à obtenir ta thèse, à avancer et tu es dorénavant au Canada. Je suis plus que fière de toi et même si ce n'est pas facile tous les jours, tu feras une excellente chercheuse !

Enfin, un grand merci à ma famille, à **mes parents**, à **Gwen**, à **Max**, à ma belle-famille, à **Juno** et notre petite **Charlie** qui a fêté ses 1 ans !! Merci à vous tous de m'avoir soutenue, de m'avoir fait tenir dans les moments difficiles. Merci également à mes oncles et tantes pour leur bienveillance. Et je garde le meilleur pour la fin, merci à toi **Romain**. Merci d'être entré dans ma vie, merci pour ton indéfectible soutien, ta bienveillance et le bonheur que tu m'as apporté durant ces 4 années. Te voilà Docteur et bientôt Postdoctorant. Je suis fière de toi !

A mes grands-parents qui ne sont plus là pour constater mon avancée, à Jacqueline et Francine qui auraient été fières de moi.

Un grand merci à tous !!

Table des matières

REMERCIEMENTS **2**

LISTE DES TABLEAUX **10**

LISTE DES FIGURES **11**

LISTE DES ABREVIATIONS **14**

AVANT-PROPOS **19**

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE. **20**

I. La maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées ou « démences séniles » : généralités et description **21**

A. Historique – du siècle des lumières au XXI siècle : la « maladie particulière du cortex cérébral » 21

B. Prévalence et incidence 22

C. Signes cliniques et diagnostic 23

1. Les symptômes neuropsychologiques 23

2. Le diagnostic de la MA 24

D. Formes génétiques et sporadiques de la maladie d'Alzheimer 26

1. Early-onset Alzheimer's disease 27

2. Late-onset Alzheimer's disease 28

II. Neurobiologie de la MA **29**

A. Développement et modifications moléculaires et cellulaires 29

1. Dégénérescence neurofibrillaire et protéine tau 30

2. Plaques amyloïdes et peptides Aβ 32

B. Neuroinflammation et stress oxydant 36

1. Les acteurs cellulaires de la neuroinflammation 36

2. Les acteurs moléculaires de l'inflammation 37

3. Barrière hématoencéphalique 41

4. Stress oxydant central et périphérique 43

a. Le stress oxydant 43

b. Rôle du stress oxydant dans la maladie d'Alzheimer 45

c. Le D-galactose : vers un nouveau modèle expérimental de la maladie d'Alzheimer 46

III. Maladie d'Alzheimer : de l'intestin au cerveau **53**

A. Maladie d'Alzheimer sporadique et pathologies nutritionnelles 53

1. Maladie d'Alzheimer et diabète 53

2. Maladie d'Alzheimer et obésité 55

B. Maladie d'Alzheimer et microbiote intestinal : axe microbiote-intestin-cerveau 57
1. La communication nerveuse : le système nerveux autonome et entérique 58
2. La communication endocrinienne : l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien 60
3. La communication chimique : les acides gras à chaine courte et les neurotransmetteurs 61
a. Les acides gras à chaine courte 61
b. Les neuromédiateurs 64
c. Les dérivés du tryptophane 65
4. La communication cellulaire et les cytokines 67
5. Impact des modifications du microbiote intestinal sur les mécanismes de la maladie d'Alzheimer : hypothèses 72
a. Alteration du microbiote intestinal et retentissement dans la MA 72
b. Inflammation systémique/neuroinflammation 73
c. Système nerveux entérique 77
d. Acides gras à courte chaine 78
e. Autres 79
6. Maladie d'Alzheimer et probiotiques 81
a. Essais sur les modèles animaux de MA 81
b. Essais chez l'homme 82

IV. Maladie d'Alzheimer et nutriments, la place de l'acide arachidonique 83
A. Alimentation, nutriments et prévention 83
1. Rôle des différents nutriments 83
2. La prévention de la maladie d'Alzheimer, les différents régimes 85
a. Le régime Méditerranéen 85
b. Le régime DASH 87
c. Le régime MIND 88
B. L'acide arachidonique 90
1. Acide arachidonique et alimentation 90
2. Acide arachidonique et effets cellulaires 92
3. Acide arachidonique et microbiote intestinal 98
4. Maladie d'Alzheimer et acide arachidonique 100
a. Rôle de l'ARA dans les fonctions synaptiques 100
b. Implication de la $cPLA_2$ et des prostaglandines synthases dans la MA 102

CHAPITRE 2 PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS. 104

CHAPITRE 3 : "DIETARY ARACHIDONIC ACID: A JANUS FACE ACTOR IN BRAIN AND ALZHEIMER'S BRAIN?" 108

CHAPITRE 4 : PREMIERE ETUDE, EFFETS D'UN APPORT ALIMENTAIRE EN ACIDE ARACHIDONIQUE DANS UN CONTEXTE MODEREMENT HYPERLIPIDIQUE 118

I. Introduction 119

II. Matériels et méthodes 121

A. Conception et production des régimes alimentaires 121

B. Méthodologies *in vivo* 126

1. Animaux et conditions d'hébergement 126
2. Protocole d'expérimentation animale 126
3. Prise de poids, prise alimentaire et hydrique 127
4. Analyses comportementales 128
   a. Logiciel d'enregistrement et d'analyse du comportement 128
   b. Étude de la mémoire à court terme - Le labyrinthe en Y 128
5. Mise à mort des animaux et prélèvement des échantillons 129

C. Méthodologies *ex vivo* 130

1. Extraction des acides nucléiques et des protéines de foie et de colon 130
2. Extraction des ARNs à partir du cerveau et du tissu adipeux 131
3. Préparation des homogénats de structures cérébrales 132
4. Evaluation de l'expression de protéines spécifiques par Western-Blotting 132
5. Mesure des taux de lipocaline-2 et d'interleukine-1β dans le sang, les fèces et le colon par ELISA 133
6. Etude de l'expression colique de protéines impliquées dans l'inflammation par la technique d'hybridation sur filtre (protéome profiler) 134
7. Etude de l'expression cérébrale de la GFAP par immunohistochimie sur coupe tissulaire 135
8. Quantification de l'expression génique au travers de RT-qPCR 136
9. Analyse du microbiote fécal par séquençage de l'ARN 16S 137
   a. Extraction de l'ADNg de fèces 138
   b. Séquençage de l'ARN 16S (réalisé par l'unité Micalis au sein de l'INRAE de Jouy-en-Josas) . 139
   c. Génération de table OTU et analyse statistique 139
10. Mesure de la perméabilité de la BHE par la fluorescéine de sodium 140
11. Analyses statistiques 141

III. Résultats 141

A. Les régimes alimentaires modérément hyperlipidiques, avec ou sans acide arachidonique, n'altèrent pas le poids des animaux et les capacités cognitives 141

B. Analyse du microbiote fécal 143

1. Diversité α et β du microbiote fécal 143
2. Analyse de l'abondance des phyla, genres et espèces 144

C. Etude des niveaux d'inflammation colique 150

1. Mesure du taux de lipocaline-2 fécale 150
2. Etude de l'expression colique de protéines impliquées dans l'inflammation par la technique d'hybridation sur filtre (proteome profiler) 150
3. Analyse de marqueurs de l'inflammation colique par RT-PCR quantitative 155
4. Étude de la barrière colique après 9 et 12 semaines de régime 157

D. Communication intestin-cerveau : niveau d'inflammation systémique 158
1. Expression hépatique des cytokines IL-1β, IL-6 et TNF-α 158
2. Expression des cytokines IL-1β, IL-6 et TNF-α dans le tissu adipeux mésentérique 159
3. Expression génique des cytokines IL-1β, IL-6 et TNF-α dans le tissu adipeux épididymaire 160
4. Impact cérébral 161
a. Perméabilité de la BHE après 12 semaines de régime 161
b. Évaluation de l'expression génique des cytokines dans le cerveau de souris nourries 9 semaines 162
c. Analyse de la présence protéique de la GFAP et Iba1 dans le cortex cérébral et les hippocampes 163

IV. Discussion 166
A. Impact des régimes alimentaires sur le microbiote fécal 167
B. Effets d'un régime modérément hyperlipidique enrichi ou non en ARA sur l'inflammation et la barrière colique 169
1. Présence d'inflammation précoce dans les fèces et screening de protéines inflammatoires dans le colon 169
..... 172
2. Impact des régimes « HL+/-ARA » sur le colon 173
a. Le régime « HL+ARA » présente une inflammation de bas grade après 9 semaines de régime. 173
b. Les régimes « HL+/-ARA » induisent une modification de la barrière colique 175
3. Impact des régimes « HL+/-ARA » au niveau systémique 178
a. Le foie 178
b. Le tissu adipeux 179
4. Impact des régimes « HL+/-ARA » au niveau cérébral 180
C. Conclusion 182

CHAPITRE 5 : ETUDE PREPARATOIRE DE L'ANALYSE DU POTENTIEL DE SOUCHES PROBIOTIQUES A LIMITER L'INFLAMMATION ET LA NEURODEGENERATION. ... 186

I. Introduction 187

II. Matériel et méthode 190
A. Manipulations des souches probiotiques 190
1. Cultures bactériennes 190
2. Étude de survie des probiotiques dans une matrice d'eau gélifiée 192
B. Expérimentations *in vivo* 193
1. Animaux et conditions d'hébergement 193
2. Survie des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal de la souris 193
3. Concentration en S. thermophilus et L. plantarum WCFS1 dans les fèces 195
4. Mise en place du modèle de D-Galactose 195
5. Analyses comportementales 196

a. Etude de la mémoire à court terme via le test de la reconnaissance d'objet 196
b. Étude de la mémoire à court terme via le test du labyrinthe en Y 198
c. Étude de la mémoire à long terme et de l'apprentissage 198
d. Étude de l'anxiété 199
C. Dosage des TBARS – stress oxydant 200
D. Etudes statistiques 201

III. Résultats 202
A. Étude de la survie des bactéries probiotiques dans une matrice Hydrogel ® et dans le tractus gastrointestinal des souris BALB/cOlaHsd 202
1. Survie des bactéries dans l'HydroGel® 202
2. Survie des bactéries dans le tractus gastro-intestinal de souris BALB/cOlaHsd males 204
B. Mise en place d'un modèle de vieillissement précoce par administration orale de D-galactose – impact de différents régimes alimentaires 207
1. Suivi pondéral des souris et de leurs organes 207
2. Analyse comportementale 207
a. Reconnaissance d'objet 207
b. Labyrinthe en Y 208
c. Piscine de Morris 209
d. Openfield 210
3. TBARS 211

IV. Discussion 212
A. Survie dans la matrice l'HydroGel® et le tractus gastro-intestinal 212
1. Expérimentations in vitro – Survie dans la matrice d'HydroGel® 212
2. Survie des bactéries dans le tractus gastro-intestinal de la souris BALB/cOlaHsd 213
B. Mise en place d'un modèle de vieillissement précoce 215
C. Conclusion 216

CONCLUSION GENERALE 218
BIBLIOGRAPHIE 223
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES 269

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales altérations génétiques dans la maladie d'Alzheimer 29
Tableau 2 : Synthèse d'études sur le D-galactose. 51
Tableau 3 : Capacité de production du butyrate et propionate par les espèces bactériennes dominantes dans le microbiote fécal humain. 62
Tableau 4 : Représentation de la composition des régimes alimentaires en pourcentage. 123
Tableau 5 : Récapitulatif des amorces de RT-qPCR. 137
Tableau 6 : Récapitulatif des résultats du protéome profiler et données complémentaires. 153
Tableau 7 : Composition du LM17 *broth*..... 191
Tableau 8 : Données chiffrées des tests de survie réalisés sur les bactéries *S. thermophilus CNRZ21* et *CNRZ160* en présence du régime « HL-ARA ». 205
Tableau 9 : Données chiffrées des tests de survie réalisés sur les bactéries *L. plantarum WCFS1* en présence du régime « HL-ARA ». 205
Tableau 10 : Données chiffrées des tests de survie réalisés sur les bactéries *S. thermophilus CNRZ21* et *CNRZ160* en présence du régime « HL+ARA »..... 206
Tableau 11 : Données chiffrées des tests de survie réalisés sur les bactéries L. plantarum WCFS1 en présence du régime « HL+ARA ». 206

Liste des figures

Figure 1 : Les différents stades de la neuropathologie Alzheimer. 31
Figure 2 : Tauopathie dans la maladie d'Alzheimer. 31
Figure 3 : Représentation du clivage protéolytique de l'APP par la voie non-amyloïdogénique et amyloïdogénique. 33
Figure 4 : La cascade amyloïde dans la maladie d'Alzheimer. 35
Figure 5 : Voie de signalisation classique et voie de trans-signalisation de l'IL-6. 39
Figure 6 : Représentation schématique en coupe transversale d'un capillaire cérébral. 41
Figure 7 : Chaîne respiratoire de la mitochondrie et Réaction de Fenton. 45
Figure 8 : Transport du D-galactose de l'ingestion jusqu'au cerveau. 47
Figure 9 : Chronologie de la modification de diversité du microbiote intestinal en fonction de l'âge. 58
Figure 10 : Schéma de l'axe HPA. 61
Figure 11 : Métabolisme du tryptophane par le microbiote intestinal de l'hôte en condition physiologique. 67
Figure 12 : Inflammasome et axe intestin-cerveau. 70
Figure 13 : Schéma des voies de communication bidirectionnelles connues entre le microbiote intestinal et le cerveau. 71
Figure 14 : Schéma de la barrière intestinale saine. 76
Figure 15 : Aperçu des interactions microbiote-intestin-cerveau dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. 80
Figure 16 : Fréquence de consommation dans le régime Méditerranéen. 86
Figure 17 : Fréquence de consommation dans le régime DASH. 88
Figure 18 : Fréquence de consommation du régime MIND. 89
Figure 19 : Synthèse de l’ARA à partir de son précurseur, l’acide linoléique. 91
Figure 20 : Protéine de transport et enzymes impliquées dans le transport et l'incorporation de l'acide arachidonique dans le cerveau. 94
Figure 21 : Métabolisme de l'ARA et synthèse des eicosanoïdes. 96
Figure 22 : Biosynthèse et signalisation dans la voie 5-lipoxygénase / leucotriène. 97
Figure 23 : Modèle du cycle protéique SNARE – Sec1/Munc18 lors de la fusion des vésicules synaptiques.... 101
Figure 24 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse de la composition en acide gras des principaux constituants lipidiques des différents régimes. 122
Figure 25 : Composition des différents régimes. 124
Figure 26 : Composition en acides gras des différents régimes alimentaires. 125
Figure 27 : Protocole expérimental 127
Figure 28 : Schéma de réalisation de l'extraction ADN/ARN/protéines. 131
Figure 29 : Principe de réaction d'anticorps en "sandwich". 134
Figure 30 : Effet des différents régimes sur le poids, la consommation alimentaire et la consommation hydrique des animaux. 142
Figure 31 : Évaluation du comportement : étude de mobilité et de mémoire à court terme dans le labyrinthe en Y. 142

Figure 32 : Représentation de l'alpha et beta diversité du microbiote fécal en fonction des différents régimes. 144
Figure 33 : Classification et nomenclature des bactéries au travers d'un exemple. 145
Figure 34 : Composition du microbiote fécal chez les animaux en début de protocole (S0) et après 9 semaines de régime. 145
Figure 35: Distribution des phyla *Bacteroidota* et *Proteobacteria* du microbiote fécal en fonction des différents régimes. 147
Figure 36 : Distribution des phyla *Desulfobacterota* et *Firmicutes* du microbiote fécal en fonction des différents régimes. 148
Figure 37 : Étude de la composition du microbiote fécal en *Actinobacteria*. 149
Figure 38 : Évaluation de la concentration de lipocaline-2 dans les fèces des animaux en début de protocole (S0), après 9 et 12 semaines de régime. 150
Figure 39: Screening de protéines inflammatoires du colon par l'intermédiaire du protéome profiler XL. 152
Figure 40: Évaluation de l'expression génique de l'IL-1β, de l'IL-6 et du TNF-α sur des échantillons de colon après 9 et 12 semaines de régime. 155
Figure 41: Évaluation de l'expression génique de CD40, de l'adiponectine et de ICAM-1 sur des échantillons de colon après 9 et 12 semaines de régime. 156
Figure 42: Évaluation de l'expression génique de la claudine 1 et de l'occludine sur des échantillons de colon après 9 et 12 semaines de régime. 158
Figure 43: Évaluation de l'expression génique de l'IL-1β, de l'IL-6 et du TNF-α sur des échantillons de foie après 9 et 12 semaines de régime. 159
Figure 44: Évaluation de l'expression génique de l'IL-1β, de l'IL-6 et du TNF-α sur des échantillons de tissu adipeux mésentérique après 9 et 12 semaines de régime. 160
Figure 45: Évaluation de l'expression génique de l'IL-1β, de l'IL-6 et du TNF-α sur des échantillons de tissu adipeux épididymaire après 9 et 12 semaines de régime. 161
Figure 46:Évaluation de la perméabilité de la BHE des différents groupes de régime par fluorimétrie. 162
Figure 47: Évaluation de l'expression génique de l'IL-1β, de l'IL-6 et de l'IL-12 et de CD40 sur des échantillons de cerveau après 9 semaines de régime. 163
Figure 48: Évaluation par Western Blot de l'expression relative de la GFAP et de l'IBA1 dans le cortex et les hippocampes des différents groupes de régimes. 164
Figure 49 : Photographies d'hippocampe et de cortex cingulaire à la suite d'immunohistochimies ciblant la GFAP sur coupe de cerveaux. 165
Figure 50 : Représentation graphique par STRING pathway des protéines mises en évidence par le protéome profiler après 9 semaines de régime. 172
Figure 51 : Représentation graphique de la proportion de protéines impliquées dans chaque termes GO donnés par STRING pathway après 9 semaines de régime. 172
Figure 52 : Récapitulatif des effets observés après une administration de 9 semaines des régimes « HL+/-ARA ». 185
Figure 53 : Résultats récapitulatifs des effets observés après une administration de 12 semaines des régimes « HL+/-ARA ». 185
Figure 54 : Visualisation d'HydroGel(R) et de nombrero. 192

Figure 55 : Schéma expérimental de la survie des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal. 194
Figure 56 : Schéma expérimental permettant d'évaluer les effets d'une administration per os de D-galactose... 196
Figure 57 : Schéma de la piscine de Morris. 199
Figure 58 : Principe du dosage des TBARs via le kit Cayman. 201
Figure 59 : Test de survie de *S. thermophilus CNRZ21* et *L. plantarum WCFS1* de 0 à 48h dans un HydroGel® en présence de Glucose, de D-Galactose, de lactose et en l'absence de sucre..... 204
Figure 60: Courbe de poids des animaux « HL-ARA/Vehicule » et « HL-ARA/D-galactose » administrés durant 6 ou 8 semaines. 207
Figure 61 : Résultats du test de reconnaissance d'objet réalisé lors de la 6ème semaine. 208
Figure 62 : Résultats du labyrinthe en Y après 4, 6 et 8 semaines d'administration du véhicule ou du D-galactose chez des animaux nourris avec le régime « HL-ARA ». 209
Figure 63 : Résultats de la piscine de Morris après 6 à 8 semaines d'administration du véhicule ou du D-galactose chez des animaux nourris avec le régime « HL-ARA »..... 210
Figure 64 : Résultats du test de l'openfield après 6 semaines d'administration du véhicule ou du D-galactose chez des animaux nourris avec le régime « HL-ARA »..... 211
Figure 65 : Niveaux des TBARS plasmatiques chez des animaux nourris avec le régime « HL-ARA » et administrés avec le véhicule ou le D-Galactose dans l'Hydrogel® durant 6 et 8 semaines. 212
Figure 66 : Effets périphérique et central de l'ARA et implication dans les fonctions synaptiques. 222

Liste des abréviations

A

Aβ : β-amyloïde

ACSL : acylCoA synthétase à longue chaîne

ACTH : hormone adrénocorticotrope

AEA : arachidonylethanolamine

AG : acide gras

AGPI : acide gras polyinsaturé

AHR : aryl hydrocarbon

ALA : α-linolenic acid

APOE : apolipoprotéine E

APP : Amyloid Precursor Protein

ATP : adénosine triphosphate

B

BACE : β-site APP cleaving enzyme ou β-sécrétase

BDNF : brain derived neurotrophic factor

BHE : barrière hémato-encéphalique

BSA : bovine serum albumine

C

CEMC : cellules endothéliales des micro-vaisseaux cérébraux

CDTA : calcium-dependent transacylase

CEMC : cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux

CLI : cellules lymphoïdes innées

COX : cyclooxygénase

$cPLA_2$: phospholipase A_2 cytosolique

CRH : corticolibérine

Ct : cycle threshold

CYP EPOX : cytochrome P450 époxygénase

Cyt c : complexe cytochrome

D

DAGL : diacylglycérol lipase

DASH : dietary approaches to stop hypertension

DiHETE : acide dihydroxyéicosatétraénoïque

DNF : dégénérescence neurofibrillaire

DSM : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

DSS : sulfate de dextran sodique

DUOX : dual oxydase

E

EET : acide epoxyeicosatétraénoïque

F

FLAP : 5-LOX Activating Protein

FOS : fructooligosaccharides

G

GABA : acide γ-aminobutyrique

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GFAP : glial fibrillary acidic protein

GLP : glucagon-like peptide

GLUT-2 : transporteur de glucose de type 2

GOS : galactooligosaccharides

H

HELIAD : Hellenic longitudinal investigation of aging and diet

HPA : hypothalamo-hypophyso-surrénalien

HETE : acide hydroxyeicosatétraénoïque

HPETE : acide hydroxyperoxyeicosatétraénoïque

H_2O_2 : peroxide d'hydrogène

I

Iba1 : allograft inflammatory factor 1

ICV : intracérébroventriculaire

IDO : indoleamine-2,3-dioxygénase

IGF : insulin-like growth factor

IL-1β : interleukine 1 β

IL-6 : interleukine 6

IL-6R : récepteur de l'interleukine 6

IMC : indice de masse corporelle

iNOS : oxyde nitrique synthase inductible

IPA : indole-3-propionic acid

IRM : imagerie par résonnance magnétique

IWG : international working group

J

JNK : c-jun N-terminal kinase

K

L

LA : linoleic acid

Lcn-2 : lipocaline-2

LCS : liquide cérébrospinal

LOX : lipoxygénase

LRP1 : low density lipoprotein receptor-related protein 1

LT : leucotriène

M

MA : maladie d'Alzheimer

MAA : maladies d'Alzheimer et apparentées

MAGL : monoacylglycérol lipase

MAMPs : modèles moléculaires associés aux micro-organismes

MAP : microtubule-associated protein

MAPK : mitogen-activated protein kinases

MCI : mild cognitive impairment

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1

MDA : malondialdehyde

MIND : mediterranean-DASH intervention for neurodegenerative delay

MMSE : mini mental state examination

MUC2 : mucine 2

N

NaFu : sodium de fluorescéine

NAPE : N-arachidonyl phosphatidylethanolamine

NF-κB : nuclear factor-κ B

NINCDS-ADRDA : National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

NOS : oxyde nitric synthase

NOX : NADPH Oxydase

O

OGlcNAcylation : β-N-acétylglucosaminylation liée à l'O

P

PARP : poly ADP ribose polymérase

PPAR-γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ

PBS : phosphate-buffered saline

PG : prostaglandine

PL : phospholipase

PSD-95 : postsynaptic density protein-95

PS : préséniline

PSEN : gene de la préséniline

Q

R

Rag1 : *recombination activating gene 1*

RCPG : récepteur couplé aux proteins G

RT : réverse-transcription

S

SAMP8 : senescence accelerated mouse-prone 8

SDS : sodium dodécylsulfate

SEM : standard error of the mean

sIL-6R : récepteur soluble de l'interleukine 6

SGLT-1 : glucose dépendant du sodium de type 1

SNA : système nerveux autonome

SNARE : soluble N-ethylmaleimide attachment receptor

SNC : système nerveux central

SNE : système nerveux entérique

SOD : superoxide dismutase

$sPLA_2$: phospholipase A_2 sécrétée

T

TDO : tryptophane-2,3-dioxygénase

TEP : tomographie par émission de positrons

TGF : transforming growth factor

TH : tryptophane hydroxylase

TLR : toll-like receptor

TMF : transplantation de microbiote fécal

TNF- α : tumor necrosis factor α

TGI : tractus gastro-intestinal

TX : thromboxane

U-Y

Z

ZO : zonula occludens

Autre

2-AG : 2-arachidonylglycérol

Avant-propos

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative associée au vieillissement et constitue à ce jour un problème de santé publique majeur grandissant dans le monde. Malgré ce constat, il n'y a actuellement aucun traitement efficace ou de moyen reconnu de prévention de cette maladie. Depuis plusieurs années, notre mode de vie est directement impliqué dans ce constat, notamment au travers d'une dégradation de notre alimentation. A ce titre, l'identification de facteurs de risques alimentaires et la mise en évidence de l'implication du lien entre l'intestin et le cerveau semblent être des pistes intéressantes à explorer.

Plusieurs travaux récents ont rapporté des déséquilibres du microbiote intestinal chez les patients atteints par la MA. Ces dysbioses pourraient être en rapport avec certains régimes alimentaires fréquents dans nos sociétés occidentales, comportant des apports déséquilibrés en acides gras ω3 et ω6 ou favorisant l'obésité. Des travaux précliniques antérieurs du laboratoire ont montré qu'un régime riche en acide arachidonique (ARA) augmente la sensibilité des souris à la neurotoxicité des oligomères de peptides β-amyloïde (Aβ), considérés comme le principal agent physiopathologique de la MA. Cependant, cette étude n'a que partiellement exploré les mécanismes liant l'apport alimentaire en ARA et la sensibilisation à la neurotoxicité des oligomères de peptide Aβ, notamment le lien intestin-cerveau et le rôle du microbiome intestinal. Ce travail de thèse présenté sous deux axes, a pour but de déterminer dans un premier temps si : 1- l'apport alimentaire d'un régime riche en ARA induit une dysbiose intestinale, 2- cette dysbiose intestinale conduit à une altération de la barrière intestinale et à une sub-inflammation systémique chronique, 3- cette sub-inflammation participe à l'altération de la barrière hématoencéphalique et conduit à une neuroinflammation cérébrale qui favoriserait la sensibilité à la MA. Dans un deuxième temps, ce travail de thèse a visé à optimiser le mode d'administration des bactéries probiotiques chez la souris et à valider un modèle de vieillissement accéléré au moyen d'une administration orale de D-galactose, se rapprochant de la pathologie Alzheimer et moins agressif que des modèles d'injection cérébrale de peptides Aβ, précédemment effectués au laboratoire Calbinotox.

Cette thèse a pour finalité de déterminer si l'apport de probiotiques pourrait par la suite contrebalancer la dysbiose intestinale observée chez des souris nourries avec un régime enrichi en ARA et dont les retombées pourraient favoriser la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MA.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique.

“Qui n’a jamais demandé à la thèse et à l'antithèse si elles étaient d'accord pour devenir synthèse ?”

Stanislaw Jerzy Lec, écrivain polonais

I. La maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées ou « démences séniles » : généralités et description

A. Historique – du siècle des lumières au XXI siècle : la « maladie particulière du cortex cérébral »

Lors de l'écriture de son Encyclopédie (1765), le philosophe français Denis Diderot, y définit la démence comme "une maladie consistant en une paralysie de l'esprit caractérisée par l'abolition de la faculté de raisonnement". Cette définition datant du siècle des lumières provient du terme latin « *demens* » et peut se traduire par « sans pensée » ou « sans intelligence ». Ce terme encadrait alors un ensemble d'étiquettes comme « l'imbécilité » ou encore « la sottise » mais était également employé pour se référer à un déclin cognitif lié au vieillissement ou à une pathologie. Lors des siècles qui suivirent, les personnes correspondant à cette « large » définition furent institutionnalisées, engendrant alors une nouvelle attitude face à la vieillesse et ses difficultés dans laquelle la science et la médecine prirent une place de premier ordre. Depuis lors, l'un des grands défis scientifiques fut d'appréhender et de comprendre la composante étiologique et épidémiologique des différentes pathologies regroupées sous l'appellation de démence. Le vieillissement de la population se faisant de plus en plus important au fil des siècles, l'étude de ces pathologies s'est révélée être d'une importance cruciale.

Le concept de démence n'a cessé d'évoluer (Pearce, 1985) et trouve sa dernière définition dans la 5ème édition du DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*). Dans ce manuel diagnostique, la démence y est définie comme un syndrome clinique caractérisé par un déclin cognitif qui touche un ou plusieurs domaines de la cognition : l'apprentissage et la mémoire, le langage, les fonctions exécutives et visuospatiales, l'attention ou encore la cognition sociale. Ces altérations cognitives interfèrent alors avec l'indépendance des patients dans leurs activités du quotidien. De nos jours, le terme « démence sénile » est employé par un grand nombre de personnes pour indiquer un déclin cognitif observé chez les personnes âgées de plus de 65 ans. Néanmoins, cette appellation s'avère inadaptée et confusionnante d'un point de vue scientifique, c'est pourquoi trois sous-catégories de démences peuvent être définies. La maladie d'Alzheimer (MA) qui est prédominante parmi les cas de démence est estimée entre 60 et 80% des cas (Alzheimer's Association, 2021). Les démences cérébrovasculaires, les démences à corps de Lewy représentent une première sous-catégorie, tandis que la dégénérescence lobaire fronto-temporale, la maladie de Parkinson et la sclérose hippocampique constituent ensemble une deuxième sous-catégorie de démence. La dernière

représente la démence mixte, et se caractérise par la présence de la MA accompagnée d'une seconde pathologie.

B. Prévalence et incidence

En France, le nombre de personnes atteintes de la MA a été estimé à 900 000 cas au cours de l'année 2019 avec une prévalence située entre 2 et 4% pour les personnes âgées de 65 ans. Ce taux augmente de façon importante avec l'âge des patients pour atteindre les 15% de la population de 80 ans (chiffres de l'INSERM). Cette pathologie a longtemps été associée aux pays développés, mais le vieillissement global de la population mondiale observé ces dernières années a contribué au développement de la MA sur l'ensemble du globe et ce, sans aucune distinction géographique. Ainsi, on recense au cours de l'année 2021 58 millions de cas dans la population mondiale, et on estime que ce nombre devrait croître de façon importante et pourrait atteindre, selon les prévisions les plus pessimistes, 132 millions de cas aux horizons de 2050 (Rafii & Aisen, 2015; Scheltens *et al.,* 2016; Sperling *et al.,* 2011). Cet accroissement, à la fois observé ces dernières années et attendu pour les prochaines décennies, s'explique en partie par le vieillissement de la génération « baby-boom » (définie entre 1946 et 1964) et l'entrée de cette population dans un âge critique pour le développement de démence.

Néanmoins, la fiabilité des différents chiffres relatant de la prévalence et du nombre de cas de la maladie, dans leur majorité, demeure discutable et peut être remis en cause aux vues des méthodes employées dans la détection de la maladie d'Alzheimer et maladies apparentées (MAA). En effet, les techniques de diagnostic utilisées en médecine courante reposent sur un examen clinique d'évaluation neuropsychologique, d'imagerie, et sur la présence de symptômes tels qu'une perte de la mémoire immédiate, qui sont retrouvés dans plusieurs autres pathologies apparentées à la MA (Wang *et al.,* 2018). L'ensemble de ces croisements symptomatiques est par conséquent à l'origine d'un problème de diagnostic différentiel entre la MA et les maladies apparentées. Ainsi, l'amélioration des outils diagnostiques, comme l'emploi de biomarqueurs (Lashley *et al.,* 2018), et leur généralisation dans la pratique médicale révèlent que 15 à 30 % des patients diagnostiqués atteints de la MA ne présentent pas les changements cérébraux caractéristiques de la pathologie. Ces révisions quant à la prévalence réelle de la MA ont également été corroborées par plusieurs études : en clinique sur des patients présentant une pathologie Alzheimer et des pathologies cérébrales (cérébrovasculaire, maladie à corps de Lewy), ou par des autopsies (James *et al.,* 2016; Kapasi *et al.,* 2017). Ainsi cette mise à jour dans les méthodes de détection de la pathologie devrait permettre, dans les années

à venir, d'affiner les diagnostiques et pourrait, en conséquence, modifier les prédictions sur la prévalence de la MA des prochaines décennies.

La MA demeure l'une des pathologies les plus coûteuses pour notre société et la forme de démence la plus courante (entre 50 et 75%). Les données mondiales statistiques du *Global Burden of Disease Study* (récoltées entre 1990 et 2013) révèlent également que la MA est une des maladies dont l'évolution est la plus rapide parmi les 50 principales affections à l'origine de perte d'année de vie au monde (GBD 2013 Risk Factors Collaborators, 2015). L'ensemble de ces données atteste de la MA comme un enjeu majeur de santé publique et sociétal. Cependant, les causes exactes de la pathologie et les projections épidémiologiques demeurent méconnues et sont à l'origine d'une recherche scientifique très active.

C. Signes cliniques et diagnostic

1. Les symptômes neuropsychologiques

Il fallut attendre près d'un siècle après la découverte de la MA par le neuropathologiste allemand Aloysius « Alöis » Alzheimer pour qu'en 1980, des critères de diagnostic définissant la démence et la MA soient adoptés (DSM-3). Ces nouveaux critères ont amélioré significativement la fiabilité du diagnostic clinique et permis de mettre en place de nouvelles études plus cohérentes et pertinentes sur des groupes de patients atteints de démence légère (Dubois *et al.,* 2007). Rapidement, beaucoup de ces études se sont penchées sur l'exploration de la MA et ont ainsi permis de caractériser différents processus cognitifs sous-tendant les altérations neuropsychologiques observées chez les patients atteints de cette pathologie.

Les premières études focalisées sur les MAA ont montré que les troubles de la mémoire épisodique (comme l'amnésie) observés chez les patients, représentent le symptôme princeps de la démence et de la MA (Jahn, 2013). Ces observations cliniques ont rapidement été corroborées par les différentes études neuropathologiques qui ont suivies. Ces dernières ont démontré que la MA, durant sa phase précoce, induit des lésions cérébrales au niveau du lobe temporal médian, constitué de l'amygdale, des hippocampes et des cortex adjacents dont le cortex enthorinal, qui sont des structures importantes pour la mémoire épisodique (Hyman *et al.,* 1984). La continuité de ces recherches a montré que les déficits de mémoire retrouvés chez ces patients sont en réalité le reflet d'une incapacité à encoder et à stocker efficacement de nouvelles informations. Ces conclusions proviennent principalement d'évaluations mnésiques sur le rappel retardé (oubli très rapide des nouveaux souvenirs qui devaient être encodés) où les

patients étaient incapables de se souvenir d'une liste entière de mots en série, ne pouvant redonner que les premiers mots de la liste (Delis *et al.*, 1991).

La propagation de la MA des structures du lobe temporo-médian vers les cortex temporaux, pariétaux et frontaux conduit à une altération de :

- la dénomination par confrontation (lorsque des images représentant un objet sont présentées aux patients, il leur est difficile de donner le nom de cet objet),
- la maitrise verbale pouvant aller jusqu'à une aphasie,
- la capacité à se rappeler des faits sur-appris (comme le nombre de jours dans un mois) (Hodges *et al.*, 1992; Hodges & Patterson, 1995).

Les patients atteints de la MA présentent également des altérations des fonctions exécutives portées sur la manipulation mentale de l'information (permettant d'orienter l'attention, trier les informations par importance et prendre des décisions), la formation de concepts (qui constitue la matière première de la pensée, associant plusieurs catégories de mots - à titre d'exemple, le travail et le repos sont considérés comme des concepts-) ainsi que sur la résolution de problèmes (Bondi *et al.*, 1993; Lafleche & Albert, 1995; Perry & Hodges, 1999). Des troubles de l'attention ont également été mis en évidence pour des tâches de mémoire à court terme se caractérisant par une perturbation de « l'exécutif central » qui se définit comme la capacité à récupérer les informations stockées sous forme consciente via la mobilisation de l'attention (Baddeley, 1981; Perry & Hodges, 1999). Pour finir, plusieurs études ont révélé la présence de déficits visuo-spatiaux, plus discrets que les déficits cognitifs précédemment décrits, chez les patients de la MA (Storandt *et al.*, 1984). La MA est donc constituée d'une multitude de symptômes contribuant à la complexité de la pathologie et dont la pluralité clinique confère une symptomatologie propre à chaque patient. Cet état de fait, couplé aux différentes comorbidités de la maladie et aux nombreuses occurrences symptomatologiques retrouvées dans d'autres démences ont contribué à définir le diagnostic de la MA comme une tâche complexe.

2. Le diagnostic de la MA

Historiquement, le NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) adopta le terme de diagnostic « probable de la MA » en 1984 pour se référer à cette pathologie (Jack *et al.*, 2011). Cette terminologie, compatible à l'époque avec la définition du DSM-3, fut

presque universellement acceptée au sein de la communauté scientifique tant le diagnostic était difficile et dont la confirmation n'arrivait que *post-mortem* suite à l'observation de lésions du tissu cérébral lors de l'autopsie (McKhann *et al.,* 1984). D'après les critères de diagnostic émis par le NINCDS-ADRDA, les patients atteints de MAA, présentaient un trouble mnésique (avec au moins deux domaines cognitifs altérés, mémoire y compris) ainsi qu'une altération de la vie quotidienne, tous deux s'aggravant avec le temps.

Afin de renforcer les méthodes diagnostiques, l'*International Working Group* (IWG) proposa en 2007 de nouveaux critères diagnostics en mettant en lumière une identité clinico-biologique de la maladie (Cummings *et al.,* 2013). L'IWG estime alors que la MA devrait être diagnostiquée grâce à des dosages biologiques ou d'exploration par imagerie et de manière indépendante aux signes cliniques de démence. Le groupe de travail identifia deux facteurs de diagnostics précis, à savoir la présence d'un phénotype clinique comportant une altération mnésique caractérisée par un faible rappel libre d'une liste de mot et la présence de biomarqueurs de la MA : les peptides β-amyloides (Aβ) (observés initialement par M. Alzheimer en 1907) par imagerie ou par analyse du liquide cérébrospinal (LCS) (Dubois *et al.,* 2007; Dubois & Albert, 2004).

En 2011, le *National Institute on Aging and the Alzheimer's Association workgroup* a formulé de nouveaux critères afin de fédérer l'approche clinique et l'étude des biomarqueurs pour améliorer les outils diagnostiques (McKhann *et al*., 2011). La définition de ces critères reprend la ligne de conduite émise en 1984 et réintègre le terme de diagnostic « probable de la MA » couplé à l'utilisation de biomarqueurs pour compléter le diagnostic avec une approche physiopathologique.

Ces critères, qui sont parmi les plus complets, sont les suivants :

1) les troubles de la cognition sont détectés et diagnostiqués sur le long terme en prenant en compte l'historique du déclin du patient et confirmés grâce à un informateur compétent ainsi qu'une évaluation cognitive objective. L'examen de l'état mental est conduit grâce à des tests neuropsychologiques comme le MMSE pour *Mini Mental State Examination,*
2) des changements de personnalité et de comportement comme par exemple des fluctuations inhabituelles de l'humeur telles que l'agitation, l'apathie ou le retrait social,
3) le diagnostic de démence probable de la MA doit être évoqué lorsque les symptômes cliniques de la maladie sont combinés avec la présence de biomarqueurs (afin d'exclure toute autre démence ou MAA), à savoir l'observation de dépôts de peptides Aβ par

imagerie TEP (tomographie par émission de positrons), l'augmentation de la protéine tau totale et phosphorylée ainsi qu'une atrophie des lobes temporaux et pariétaux en imagerie par résonnance magnétique IRM (*ces différents marqueurs histologiques de la pathologie, employés comme biomarqueurs, seront décrits dans la section neurobiologie de ce manuscrit*).

Les difficultés de diagnostic de la MA sont renforcées par une présentation clinique hétérogène de la pathologie. Afin de prendre en compte cette particularité, l'IWG-2 proposa en 2011 des nouveaux critères de diagnostic pour classifier la MA en 4 sous-groupes (Dubois *et al.*, 2014). Tout d'abord, la MA dite « typique », remplit tous les pré-requis précédemment définis à savoir les troubles cognitifs et comportementaux. La variation de la MA dite « atypique » présente les mêmes biomarqueurs mais regroupe un ensemble de patients dont les symptômes cliniques se définissent principalement par des troubles visuo-spatiaux ou du langage. La MA « mixte » définit des patients présentant les marqueurs de la MA ainsi que des marqueurs propres à d'autres pathologies et dont les comorbidités les plus fréquemment associées sont les maladies cardiovasculaires (Stakos *et al.*, 2020). Enfin la dernière catégorie regroupe les stades précliniques de la pathologie, c'est-à-dire avant l'apparition des symptômes cliniques.

D. Formes génétiques et sporadiques de la maladie d'Alzheimer

Les patients affectés par la MA sont classés en deux catégories, selon la terminologie anglo-saxonne, en fonction de l'âge d'apparition de la maladie mais, en définitive, ces deux catégories recouvrent des mécanismes différents. Une grande majorité des patients (>99%) développent la maladie, qualifiée de tardive (*late-onset Alzheimer's disease*), après 65 ans tandis que le petit pourcentage restant développe la maladie bien plus précocement dans leur vie, entre 40 et 50 ans (*early-onset Alzheimer's disease*). Ces deux types de maladie sont indiscernables cliniquement parlant, bien que la MA dite précoce présente généralement des symptômes plus sévères et progresse plus rapidement que son homologue tardive. La forme précoce est induite par plusieurs mutations sur 3 gènes (forme génétique de la MA) alors que la forme tardive est dite sporadique bien que son risque d'apparition soit modulé par certains polymorphismes génétiques.

1. Early-onset Alzheimer's disease

Des mutations rares ont été identifiées dans la forme familiale sur le gène codant la protéine APP (*Amyloid Protein Precursor*), et les gènes PSEN1 et PSEN2 (codant les protéines préséniline ou PS -1 et -2 impliquées dans le complexe γ-secrétase qui hydrolyse la protéine APP et génère les peptides Aβ (Goate *et al.,* 1991; Levy-Lahad *et al.,* 1995; Rogaev *et al.,* 1995). Les mutations sur ces trois gènes ont une pénétrance élevée (>85%), se transmettent de façon autosomique dominante et la présence de ces mutations dans le génome du patient conduit presque avec certitude à l'agrégation de peptides Aβ et à une apparition précoce de la maladie. Les mutations du gène de l'APP représentent moins de 0,1% des cas de la MA et sont repérées occasionnellement dans des familles de patients atteints de la MA dont les symptômes sont apparus plus tardivement (Athan *et al.,* 2001).

Les mutations de l'APP sont situées soit immédiatement avant le site de clivage de la β-sécrétase, peu après le site de la α-sécrétase, soit non loin du site de clivage de la γ-sécrétase du côté COOH-terminal (Goate *et al.,* 1991). Ces mutations faux-sens conduisent à la MA en altérant la protéolyse au niveau des trois sites de clivage des sécrétases. Cette hypothèse a été confirmée par l'analyse de chacune des mutations, d'abord dans des cellules transfectées ou des cellules primaires de patients puis dans des modèles murins transgéniques (Selkoe, 1997). Les familles hébergeant des mutations faux-sens de l'APP qui causent la MA, présentent généralement une apparition de la maladie avant l'âge de 65 ans, souvent dans la cinquantaine (Selkoe, 1997).

En termes de chiffre, 182 mutations différentes liées à la MA dans plus de 400 familles ont pu être mises en évidence sur le gène PSEN1, tandis que seulement 14 mutations ont été détectées dans 23 familles différentes pour le gène de la PSEN2 (Athan *et al.,* 2001). La majorité des mutations sur les PSEN1 et 2 toutes confondues provoquent des substitutions d'un seul nucléotide mais des suppressions et insertions peuvent également être repérées. Les modifications génétiques sur ces gènes bouleversent le clivage protéolytique de l'APP, entrainant une augmentation du ratio $A\beta_{1-42}$/ $A\beta_{1-40}$ (*que nous aborderons plus tard dans cette thèse*) (Tanzi, 2012).

Bien que ces mutations conduisent à des formes rares de la MA, leur découverte a grandement éclairé les mécanismes physiopathologiques de la maladie.

2. Late-onset Alzheimer's disease

Les gènes impliqués dans la MA tardive augmentent le risque de survenue de la maladie. L'apparition de la MA a été montrée comme étant plus fréquente chez des jumeaux homozygotes comparativement à des jumeaux dizygotes, ce qui suggère une contribution génétique importante dans la MA (Gatz *et al.,* 2006). Dans une large étude sur la démence de jumeaux de plus de 65 ans, un des deux jumeaux ou les deux étaient atteints de la MA ce qui a permis de montrer l'héritabilité de la MA tardive (entre 58 et 79% selon si un jumeau ou les deux sont touchés) (Gatz *et al.,* 2006).

L'apolipoprotéine E ou APOE situé sur le chromosome 19 a été le premier gène impliqué dans le risque de survenue de la forme tardive de la MA. L'APOE est une protéine exprimée chez l'homme liant les lipides et présente dans les VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) et les chylomicrons sériques. Elle est surtout la principale apolipoprotéine exprimée dans le cerveau et entrant dans la composition des particules lipoprotéiques du tissu cérébral. Il existe trois isoformes courantes de l'APOE, à savoir APOE ε2, APOE ε3 et APOE ε4. La présence d'un seul allèle APOE ε4 est associée à une augmentation de 2 à 3 fois du risque de développer la MA. De plus, la présence de deux copies de cet allèle est associée à une augmentation par 5 du risque de survenue de la MA (Kurz *et al.,* 1996; Poirier *et al.,* 1993). L'étude de Farlow et ses collaborateurs a rapporté que la présence de l'allèle APOE ε4 est associée à des troubles de la mémoire ainsi qu'à la progression des troubles cognitifs modérés ou MCI (*Mild Cognitive Impairment*) au cours du temps (Farlow *et al*., 2004). Alors que plusieurs études semblent lier l'APOE ε4 à la MA, la présence de cet allèle n'est ni nécessaire ni suffisante pour induire à lui seul la maladie (comme les mutations du *early-onset disease*). D'après l'étude de Myers portant sur l'apparition de la MA chez des personnes possédant un, deux ou aucun des allèles APOE ε4, 55% des participants homozygotes, 27% des participants n'ayant qu'un seul allèle et 9% n'ayant aucun allèle ont développé la MA à l'âge de 85 ans (Myers *et al.,* 1996). En 1998, Slooter et collaborateurs ont conclu que le risque attribuable lié à APOE- ε4 à la population présentant une démence est estimé à 20% (Slooter *et al.,* 1998).

Des centaines d'études ont par la suite cherché à mettre en évidence le rôle d'autres gènes dans l'émergence de la MA. Des études d'association à l'échelle du génome ont identifié des polymorphismes des gènes CLU, PICALM, CR1 et BIN1 comme facteurs de susceptibilité de la maladie (Harold *et al.,* 2009; Lambert *et al.,* 2009; Seshadri *et al.,* 2010) impliqués dans la réponse immunitaire, le métabolisme des lipides et l'endocytose (Reitz & Mayeux, 2014). Une majorité des gènes augmentant le risque de survenue des formes sporadiques de la MA

tardive est impliquée dans le métabolisme des lipides, suggérant que le métabolisme lipidique et les désordres liés jouent un rôle important dans la pathologie d'Alzheimer (*Tableau 1*) (Poirier *et al.*, 2014).

Tableau 1 : Principales altérations génétiques dans la maladie d'Alzheimer

Gène	Principale altération	Apparition
APP (*Amyloid precursor protein*)	Mutation	Autosomal dominant, principalement *early-onset disease*
PSEN1 (Préséniline 1)	Mutation	Autosomal dominant, principalement *early-onset disease*
PSEN2 (Préséniline 2)	Mutation	Autosomal dominant, principalement *early-onset disease*
APOE (*Apolipoprotéin-E*)	Variant commun	*Late-onset disease*
SORL1 (*Sortilin-related-receptor L*)	Variant commun	*Late-onset disease*
CLU (*Clusterin*)	Variant commun	*Late-onset disease*
PICALM (*Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein*)	Variant commun	*Late-onset disease*
CR1 (*Complement component receptor 1*)	Variant commun	*Late-onset disease*
BIN1 (*Bridging integrator 1*)	Variant commun	*Late-onset disease*

II. Neurobiologie de la MA

A. Développement et modifications moléculaires et cellulaires

Depuis la découverte de la pathologie, les mécanismes identifiés dans les formes familiales de la MA (APP, PS1) ont éclairé les observations d'Aloïs Alzheimer dans les années 1900. Dès lors, la MA a été caractérisée par deux marques histologiques bien distinctes au niveau cérébral associées à une perte synaptique et neuronale importante : les plaques amyloïdes et les faisceaux neurofibrillaires. Ces lésions cérébrales sont constituées d'agrégats protéiques

insolubles, respectivement des agrégats de peptides Aβ et des agrégats de protéines tau hyperphosphorylées.

1. Dégénérescence neurofibrillaire et protéine tau

La protéine tau est une protéine associée aux microtubules ou MAP (*Microtubule-Associated Protein*) faisant partie intégrante du cytosquelette des cellules neuronales. Cette protéine est codée par le gène MAPT (*Microtubule-Associated Protein Tau*), découvert en 1986 et situé sur le chromosome 17 (en position 17q21) pour lequel il existe 6 isoformes différents au niveau cérébral chez l'homme. L'une des principales fonctions de la protéine tau est la modulation de la stabilité des microtubules axonaux. Cette protéine, générée partiellement stable est toujours dynamique. Elle permet la croissance axonale et rend efficace le transport au niveau des axones.

Le plus long isoforme (2N4R) de la protéine tau comprend 85 sites potentiels de phosphorylation avec 45 sérines, 35 thréonines et 5 tyrosines, la plupart d'entre eux étant accessible grâce à la structure dépliée de la protéine (Hanger *et al.,* 2009). Parmi ces sites potentiels de phosphorylation, 17 motifs thréonine-proline ou sérine-proline sont d'un intérêt bien particulier puisqu'ils sont la cible de plusieurs kinases (telles que CDK5 ou *Cyclin-Dependant Kinase*, GSK3 ou *Glycogen Synthase Kinase* et ERK1/2 ou *Extracellular signal-Regulated Kinase*) et sont anormalement hyperphosphorylés dans la MA (Martin *et al.,* 2013). Chez les patients atteints de la MA, la protéine tau hyperphosphorylée conduit à une accumulation anormale de la protéine dans le corps cellulaire et les dendrites des neurones, formant des faisceaux neurofibrillaires et par conséquent, une dégénérescence neurofibrillaire (DNF). La protéine s'assemble alors aux filaments hélicoïdaux et perd sa capacité à se lier aux microtubules, diminuant son aptitude à garder une bonne organisation du cytosquelette (Kolarova *et al.,* 2012). L'hyperphosphorylation de tau ainsi que la formation des DNFs conduisent à terme à inhiber l'assemblage et la stabilité des microtubules et par conséquent altèrent les transports axonaux (*Figure 1, p.31)* (Hanger *et al*., 2009 ; Kosik, 1990; Nisbet *et al*., 2015).

Les DNFs émergent précocement dans la MA lorsque le cortex trans-entorhinal est affecté (stade S1, *Figure 2, p.31*). Les dégénérescences augmentent tout au long du développement de la pathologie, du stade S1 précédemment cité au stade S10 dans les aires néocorticales (impliquées dans les fonctions cognitives supérieures) en passant par les

hippocampes, les cortex temporal, frontal et pariétal et peuvent donc être à l'origine d'altérations progressives des neurones et du transport neuronal (*Figure 2*).

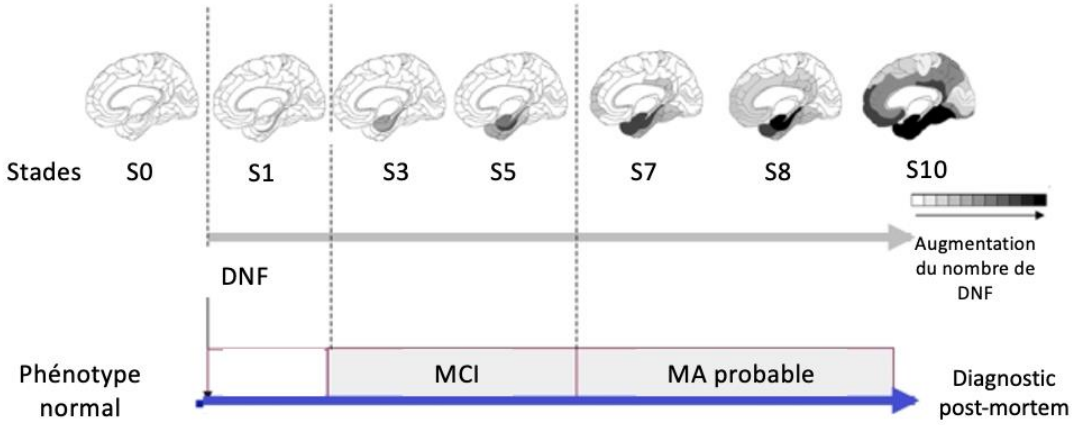


Figure 1 : Les différents stades de la neuropathologie Alzheimer. Evolution de la tauopathie d'après Schraen-Maschke et al., 2008.

La progression de la maladie d'Alzheimer est caractérisée par 10 stades en concordance avec l'apparition des différentes phases cliniques : stade S1 touchant le cortex transentorhinal, S2 le cortex entorhinal, S3 les hippocampes, S4 à S6 le cortex temporal, S7 les cortex préfrontal, pariétal et temporal, S8 les aires unimodales, S9 les aires sensori-motrices et S10 les aires neocorticales. MCI : Mild Cognitive Impairment, MA : Maladie d'Alzheimer, DNF : dégénérescence neurofibrillaire.

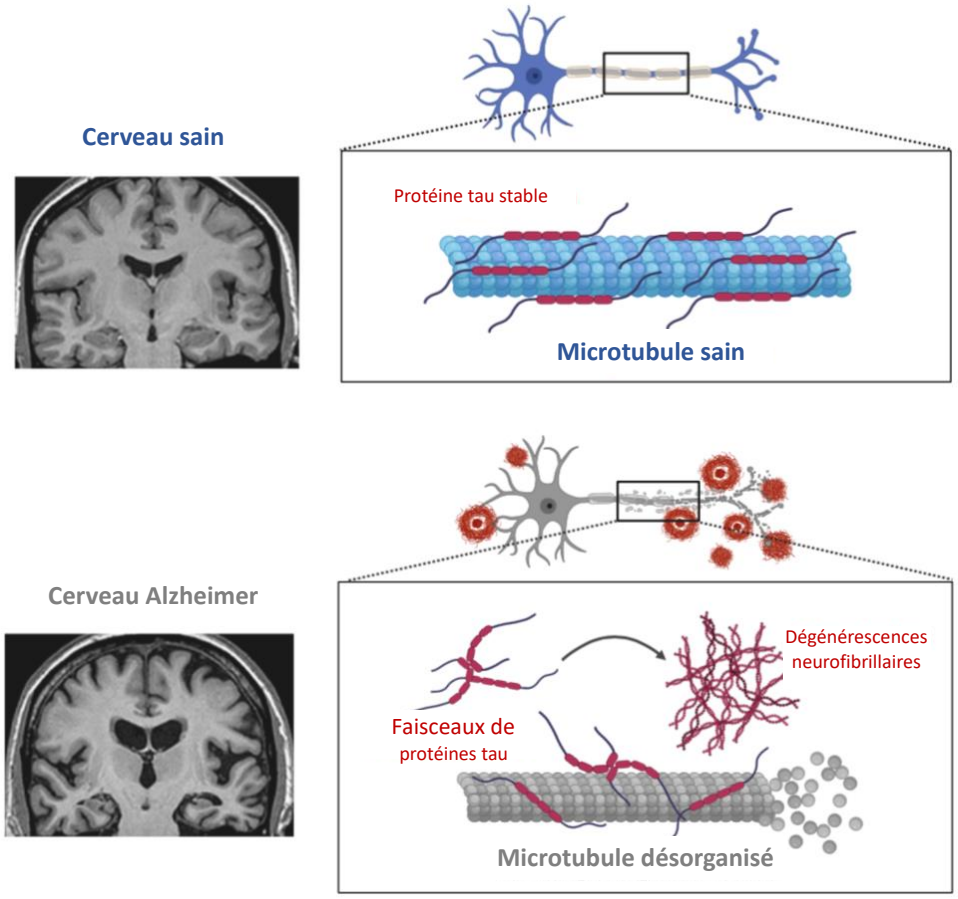


Figure 2 : Tauopathie dans la maladie d'Alzheimer. Figure réalisée avec BioRender.

2. Plaques amyloïdes et peptides Aβ

Le peptide Aβ est issu du clivage de la protéine APP transmembranaire et ubiquitaire, concentrée essentiellement dans les synapses. Cette protéine est impliquée dans plusieurs mécanismes tels que la formation de synapses ou encore la plasticité neuronale. Le clivage de la protéine APP peut s'effectuer via deux voies différentes, nommées voies non-amyloïdogénique et voie amyloïdogénique (F*igure 3, p.33*).

La voie non-amyloïdogénique débute par le clivage de l'APP par l'enzyme α-sécrétase qui aboutit à la formation des peptides CTF*α* ou C83 (*C-Terminal Fragment α*) et sAPP*α* (*soluble α-Amyloïd Precursor Protein*). CTF*α* est ensuite clivé par la *γ*-sécrétase formant deux nouveaux peptides, le fragment p3 et le AICD (*APP IntraCellular Domain*). Le clivage de l'APP par l'*α*-sécrétase représente 90% du clivage de l'APP initial et les 10% restants qui résultent du clivage en majorité par la β-sécrétase BACE-1 (pour *β-site APP cleaving enzyme*), conduisent à la production de peptides Aβ. BACE-1 et BACE-2 sont deux β-sécrétases mais parmi ces deux enzymes, BACE-1 est l'acteur majeur de la MA (Vassar, 2004). C'est une protéase aspartique transmembranaire de type 1 à 501 acides aminés apparentée à la famille des pepsines. Le domaine catalytique de BACE-1 contient deux motifs de protéase aspartique (Asp-Thr/Ser-Gly-Ser/Thr) qui forment le site actif de l'enzyme et sont orientés dans la lumière des compartiments intracellulaires acides pour cliver le site β-sécrétase de l'APP (Vassar, 2004). BACE-1 est retrouvée en concentrations les plus élevées dans les neurones et permet via son activité enzymatique, d'augmenter la génération de peptides Aβ (Vassar, 2004).

La voie amyloïdogénique débute par le clivage de l'APP par la β-sécrétase conduisant à la formation des fragments CTFβ ou C99 (*C-Terminal Fragment β*) et du sAPPβ (*soluble β-Amyloïd Precursor Protein*). Par la suite, le CTFβ va être clivé par la *γ*-sécrétase, une protéase intramembranaire composée d'un complexe de quatre protéines individuelles : PS1, nicastrine, APH-1 (*anterior pharynx-defective 1*) et PEN-2 (*presenilin enhancer 2*) (Kaether *et al.*, 2006; Sobhanifar *et al.*, 2010), afin de produire des peptides Aβ (*Figure 3, p.33*).

Ce CTFβ conduit à la production de deux types de peptides Aβ : l'$A\beta_{1-40}$ (ou Aβ40) représentant 90% de la production et l'$A\beta_{1-42}$ (ou Aβ42) correspondant au pourcentage restant. Au niveau physiologique, l'APP est clivé par l'α-sécrétase (par la voie non-amyloïdogénique) en un fragment à caractère non toxique. En revanche dans la MA, l'APP est clivé par la β puis γ-sécrétase (par la voie amyloïdogénique) ce qui aboutit à des peptides toxiques anormalement sécrétés en grande quantité qui ont tendance à s'agréger dans le cerveau.

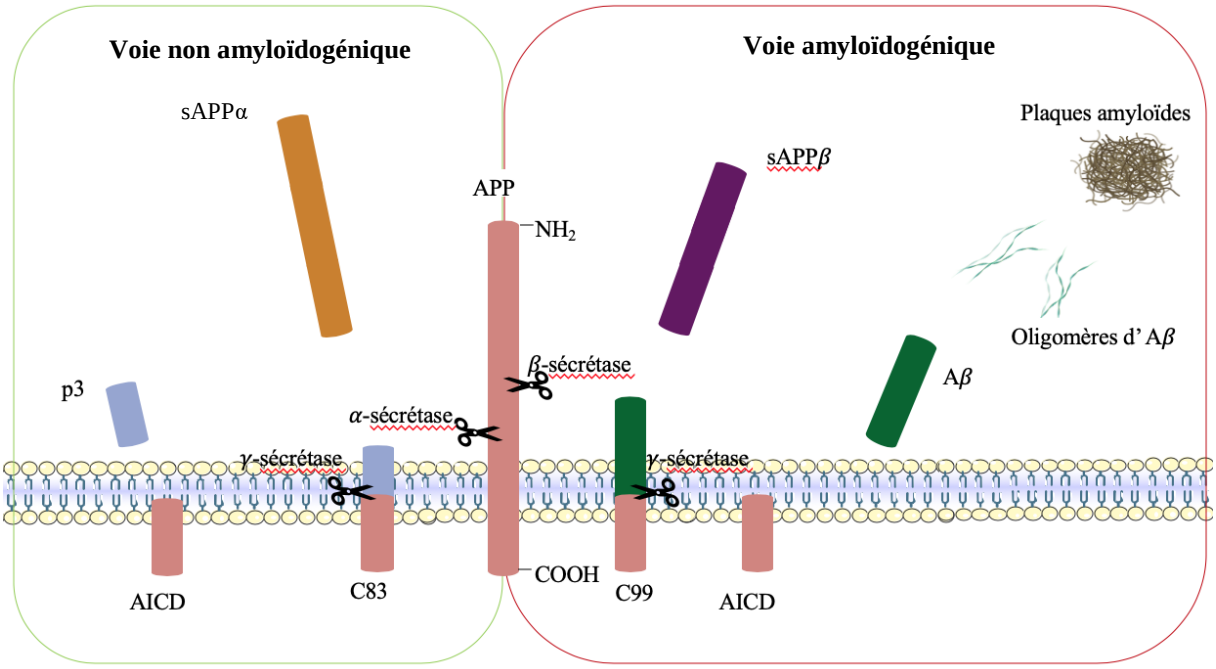


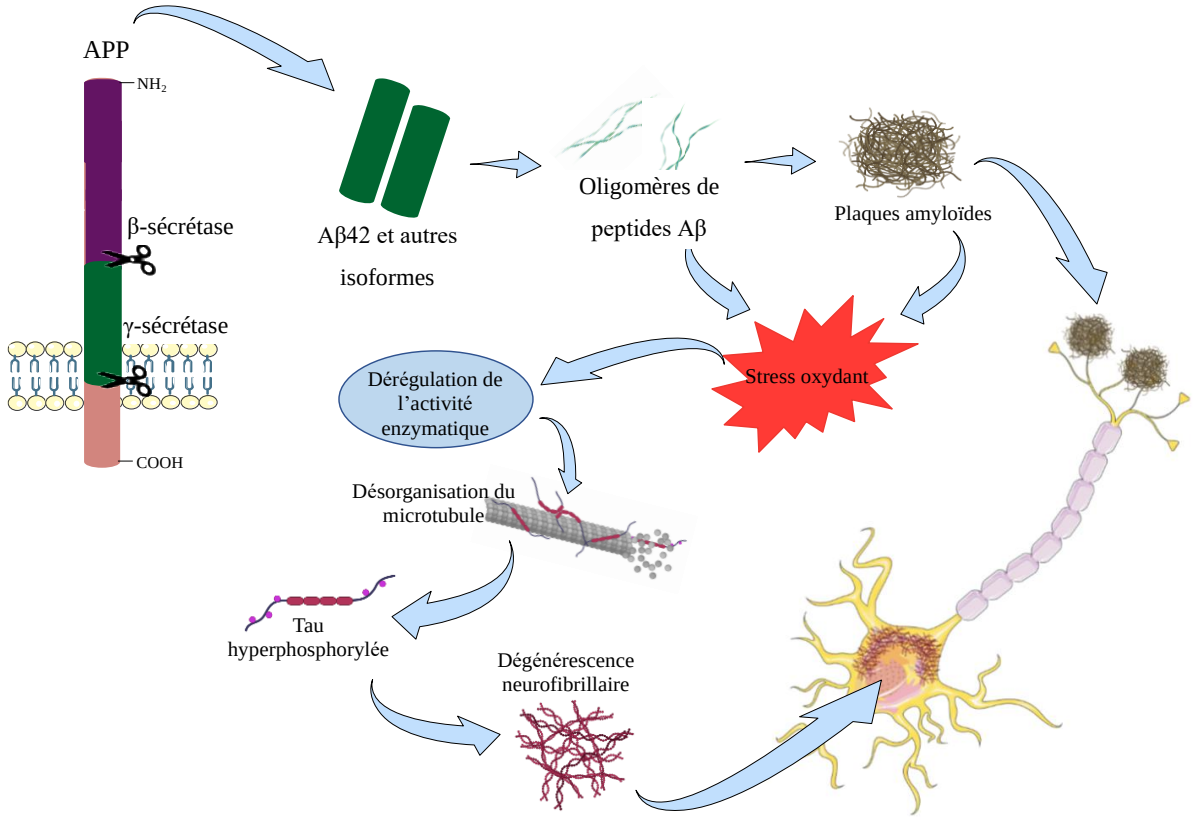
Figure 3 : Représentation du clivage protéolytique de l'APP par la voie non-amyloïdogénique et amyloïdogénique.

L'APP peut être clivé suivant deux voies bien distinctes : la voie non amyloïdogénique aboutissant à la formation des fragments sAPPα et p3 et la voie amyloïdogénique aboutissant à la formation des fragments sAPPβ et Aβ. Figure réalisée avec BioRender.

Par ailleurs, dans certains cas, on retrouve un défaut dans l'excrétion de ce peptide du compartiment cérébral ce qui entraine également son agrégation ou bien une augmentation de sa concentration dans les vaisseaux, conduisant à une angiopathie amyloïde. Il est admis que le ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ est lié à l'apparition de la pathologie et particulièrement à l'âge d'émergence de la maladie. Un fort ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ indique une surproduction de peptides $A\beta_{1-42}$ ainsi qu'une diminution de sa clairance et donc un développement de la MA en lien avec la forte toxicité de la forme $A\beta_{1-42}$, peu importe l'âge de l'individu (Niemantsverdriet *et al.*, 2017). Le caractère hydrophobe et fibrillogène du peptide $A\beta_{1-42}$ entraine la formation des plaques amyloïdes (agrégats très denses de peptides Aβ), observées chez les patients atteints de la MA, associées aux phénomènes de neurodégénérescence ou encore de neuroinflammation (Butterfield & Boyd-Kimball, 2004; Wesson *et al.*, 2011). Au-delà de l'augmentation de la production du peptide Aβ, la clairance de ce dernier est également altérée chez les patients atteints de la MA, conduisant à une accumulation du peptide dans le cerveau des patients (Baranello *et al.*, 2015; Soldano & Hassan, 2014). Les peptides Aβ ne sont pas retrouvés uniquement dans le cerveau des patients, mais également dans le plasma ou encore le LCS

(Hameed *et al.*, 2020) et la mesure de leurs concentrations dans le LCS est utilisée actuellement comme aide au diagnostic de la maladie (Hameed *et al*., 2020).

L'hypothèse la plus connue sur le mécanisme de la MA, est celle de la cascade amyloïde. Selon cette hypothèse, le peptide Aβ jouerait un rôle central et serait le déclencheur d'une cascade d'évènements aboutissant à la neurodégénérescence observée chez les patients (*Figure 4, p.35*). Cette hypothèse de la cascade amyloïde dépend en premier lieu de la présence de mutations génétiques affectant la production de peptides Aβ, en faveur du peptide $A\beta_{1-42}$ ou Aβ42. Cette hypothèse schématisée en *Figure 4* fait le postulat qu'une augmentation de la production de peptides Aβ, la diminution de sa clairance et une augmentation du ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$, conduisent à une oligomérisation ainsi qu'un dépôt diffus initial de peptides $A\beta_{1-42}$ ayant des effets sur les fonctions synaptiques. S'en suit donc une réponse inflammatoire et la formation de plaques amyloïdes puis une atteinte progressive synaptique et neuronale. Cette cascade altère par ailleurs l'homéostasie ionique neuronale et provoque des dommages oxydatifs aboutissant à l'oligomérisation et l'hyperphosphorylation de la protéine tau ainsi qu'un dysfonctionnement neuronal généralisé et à la mort des cellules associés à des déficits de neurotransmetteurs. Le tout conduit à la démence avec présence de plaques amyloïdes et de faisceaux neurofibrillaires (Barage & Sonawane 2015).



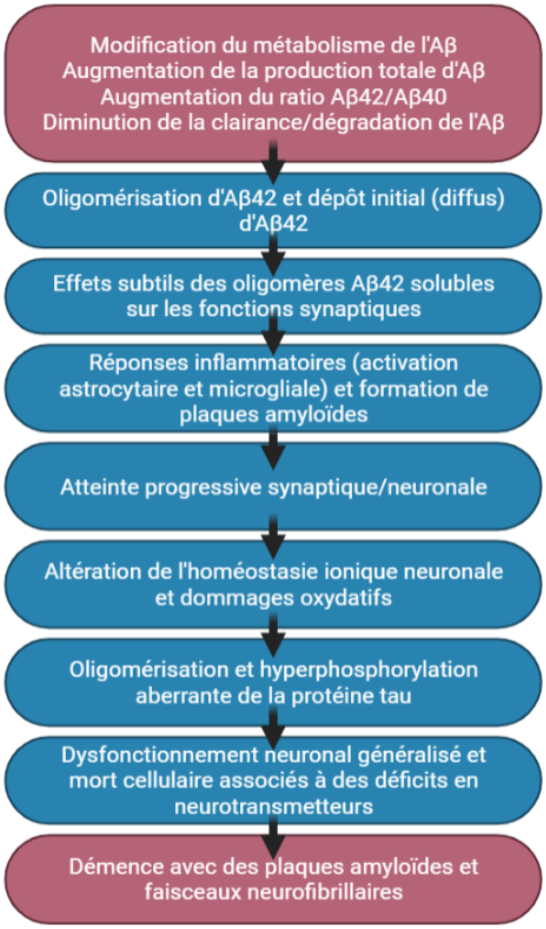


Figure 4 : La cascade amyloïde dans la maladie d'Alzheimer.

Figure est réalisée avec Biorender d'après Anoop et al., 2010 et Barrage & Sonawane, 2015.

En résumé, les causes et mécanismes exacts de l'accumulation des peptides $A\beta_{1-42}$ et de l'hyperphosphorylation de la protéine tau dans les formes sporadiques de la MA ne sont pas encore entièrement élucidés. La MA se définir donc comme une maladie multifactorielle dans laquelle différents mécanismes neurodégénératifs sont associés à des perturbations de l'environnement neuronal et de la transmission synaptique. Ainsi, l'inflammation chronique ou encore la génération excessive d'espèces réactives de l'oxygène sont étroitement liées à la physiopathologie Alzheimer.

B. Neuroinflammation et stress oxydant

1. Les acteurs cellulaires de la neuroinflammation

La réponse immunitaire est médiée par deux types cellulaires bien distincts dans le système nerveux central (SNC), les cellules microgliales et les astrocytes. L'activation de ces cellules conduit à la libération d'acteurs pro-inflammatoires et cytotoxiques. Ces cellules sont retrouvées en grande concentration dans l'environnement des plaques amyloïdes et des DNFs chez les patients atteints de la MA (Rozemuller *et al.*, 1992).

La microglie est activée bien avant la formation de plaques amyloïdes et possède une double casquette. En effet, ces cellules de défense sont capables de fixer la protéine tau phosphorylée et le peptide Aβ soluble et fibrillaire ce qui conduit au déclenchement d'une réponse inflammatoire et la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires. Cette réponse se révèle neurotoxique lorsque la microglie est suractivée pendant une longue durée, ce qui est le cas de la MA. La microglie promeut également l'agrégation et le dépôt des peptides Aβ (Guo *et al.*, 2002), et régule la transcription de la β-sécrétase BACE-1 impliquée dans la génération de ces peptides (Sastre *et al.*, 2003).

Cependant, la microglie possède également des effets bénéfiques neuroprotecteurs puisqu'elle participe à l'élimination des peptides Aβ. En effet, les fibrilles de peptides Aβ, par leur liaison au récepteur C3 du complément ou aux récepteurs FcRγI et FcγRIII des immunoglobulines au niveau de la microglie, vont induire la phagocytose des fibrilles de peptides Aβ. Ces liaisons vont également induire la sécrétion d'enzymes protéolytiques telles que *l'Insulin-Degrading Enzyme* ou encore la *plasminogen-plasmin complex* conduisant à la dégradation des peptides Aβ (Ahmad *et al.*, 2019; Koenigsknecht & Landreth, 2004). Dans la MA, les capacités protectrices de la microglie sont dépassées, en partie en raison de son activation chronique liée à l'accumulation de peptides Aβ. Cette activation sur une longue durée

contribue à l'émergence et au développement d'une boucle neurotoxique dans laquelle le peptide Aβ possède un rôle important.

La deuxième population cellulaire majeure impliquée dans la neuroinflammation est celle des astrocytes. L'une des fonctions essentielles des astrocytes est la régulation de la neurotransmission et la prévention de l'excitotoxicité puisqu'ils peuvent absorber les neurotransmetteurs tels que le glutamate ou l'acide γ-aminobutyrique (GABA) libérés au niveau des fentes synaptiques et sont également capables de libérer leurs précurseurs (Sofroniew & Vinters, 2010). Bien que le glutamate soit un des neurotransmetteurs excitateurs les plus répandus dans le cerveau (Curtis & Johnston, 1974), un excès de celui-ci dans une synapse aboutit à une hyperexcitation neuronale et à la mort neuronale si elle persiste. Ce processus nommé « excitotoxicité du glutamate » intervient dans plusieurs maladies inflammatoires et neurodégénératives du SNC dont la MA (Dong *et al.,* 2009). En outre, les astrocytes jouent un rôle dans la clairance des peptides Aβ via leur dégradation par protéolyse (Ries & Sastre, 2016). En effet, les astrocytes expriment des enzymes de dégradation des peptides Aβ telles que la néprilysine, une metalloproteinase qui hydrolyse les peptides présents au niveau cérébral. En revanche, lorsque les astrocytes sont exposés à des taux élevés de peptides Aβ de manière chronique, ils perdent leur capacité à éliminer ces peptides (Guénette, 2003). A l'instar de la microglie, les astrocytes eux aussi ont la capacité de promouvoir l'agrégation ainsi que le dépôt des peptides Aβ (Guo *et al.,* 2002), et régulent la transcription de la β-sécrétase BACE-1 impliquée dans la génération de ces peptides (Sastre *et al.,* 2003).

2. Les acteurs moléculaires de l'inflammation

Les cellules microgliales et les astrocytes activés dans la MA produisent des cytokines pro-inflammatoires que sont principalement le TNF-*α* (*tumor necrosis factor-α*), l'IL-1β, l'IL-6 et l'interféron-*γ* (IFN-*γ*). Lors des phases précoces de la MA, le TNF-*α* a été trouvé en plus forte concentration dans le LCS de patients comparé à des sujets sains (Tang *et al.,* 2011). Le TNF-*α* favorise le clivage pro-amyloïde de l'APP par les β et *γ*-sécrétases (respectivement par activation de la voie NF-κB pour *nuclear factor-κ B* et JNK pour *c-Jun N-terminal kinase*) (Foley, 2007; Kuo *et al.,* 2008). L'IL-1β, est sécrétée par les cellules microgliales et astrocytaires à partir de son précurseur la pro-IL-1β. Au même titre que le TNF-*α,* la sécrétion de l'IL-1β favorise sa propre production ainsi que celle de l'IL-6 par les cellules microgliales et astrocytaires environnantes (Chen *et al.,* 2016b; Choi *et al.,* 2014). La coexistence d'une

neuroinflammation et de la production d'IL-1β a été documentée pour la première fois dans le cadre de la MA dans les années 80 (Griffin *et al.,* 1989; McGeer *et al.,* 1987). L'attribution du rôle de l'IL-1β dans la physiopathologie de la MA s'est longtemps appuyée sur des preuves indirectes comme par exemple via l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (McGeer & McGeer, 2007; Moore & O'Banion, 2002). En revanche, le travail fournit par Shaftel et collaborateurs en 2007 a montré que l'expression d'IL-1β dans les hippocampes par la microglie et les astrocytes peut être la base d'une réponse neuroinflammatoire et avoir un rôle adaptatif dans un modèle murin de la MA après 4 semaines (Shaftel *et al.,* 2007). L'excès d'IL-1β participe à l'installation et à l'entretien d'un processus neuroinflammatoire et induit par la même occasion une production de peptides Aβ en agissant sur l'activité de la γ-sécrétase des neurones ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de la protéine tau au travers de la voie de signalisation MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) (Li *et al.,* 2003; Liao *et al.,* 2004). Le TNF-α et l'IL-1β activent également le facteur de transcription NF-κB ce qui induit l'expression de cyclooxygénases (ou COX) 2 dans les astrocytes activés, une molécule liée à la formation de prostaglandine et au processus de neuroinflammation (Barger & Mattson, 1996; Koo *et al.,* 2010). Il a également été suggéré que NF-κB joue un rôle important dans le maintien du cycle de la réponse inflammatoire ainsi que dans les interactions entre les neurones et les astrocytes (Pugazhenthi *et al.,* 2013). Par ailleurs, dans la MA, NF-κB induit l'expression de la β-sécrétase associée à la production de peptides Aβ (Chen *et al.,* 2012). L'activation de PPAR-γ (*Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ*) au niveau de la microglie permet de diminuer l'expression des cytokines inflammatoires et leur induction par la voie NF-κB (Chen *et al.,* 2012). PPAR-γ fait partie de la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires, un facteur de transcription inductible par un ligand dont les activités sont régulées par des métabolites lipidiques et stéroïdiens (Kummer & Heneka, 2008). Dans des conditions physiologiques, PPAR-γ est exprimé à de faibles niveaux dans le cerveau, contrairement aux patients atteints de la MA (de la Monte & Tong, 2014).

L'IL-6 est une cytokine majeure sécrétée par la microglie et les astrocytes dans le SNC, jouant un rôle important dans le cerveau. Elle est connue pour participer à la neurogenèse et à la réponse des neurones matures ainsi que des cellules gliales dans des conditions normales mais également dans un large éventail de modèles de lésions (ischémie, traumatismes…) (Erta *et al.,* 2012). Cette cytokine a pour rôle de favoriser le recrutement des cellules astrocytaires et microgliales dans le but de libérer de nouvelles cytokines pro-inflammatoires. L'IL-6 est connue comme pouvant stimuler une réponse dans une cellule cible de deux manières différentes :

- la signalisation classique (catégorisée comme étant anti-inflammatoire) implique la liaison de l'IL-6 à l'IL-6R (récepteur de l'IL-6) lié à la membrane qui initie la dimérisation de la glycoprotéine 130 (exprimée de manière ubiquitaire sur tous les types cellulaire) et la signalisation JAK/STAT (*janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) notamment (Hibi *et al.*, 1990; Taga *et al.*, 1989) (*Figure 5A*),
- dans la signalisation alternative le IL-6R soluble (sIL-6R) peut quant à lui former un complexe avec l'IL-6 et stimuler des cellules distantes qui expriment la glycoprotéine 130 mais pas l'IL-6R lié à la surface, ce qui englobe la plupart des types neuronaux, les cellules endothéliales, les oligodendrocytes et de nombreux autres types cellulaires, dans un processus appelé trans-signalisation catégorisé comme étant pro-inflammatoire (Rose-John et Heinrich 1994) (*Figure 5B*).

La majorité des cellules qui répondent à l'IL-6 pendant l'inflammation n'expriment pas nécessairement l'IL-6R et ne répondent donc pas directement à la cytokine mais en revanche, la trans-signalisation permet de cibler les cellules distantes grâce au sIL-6R.

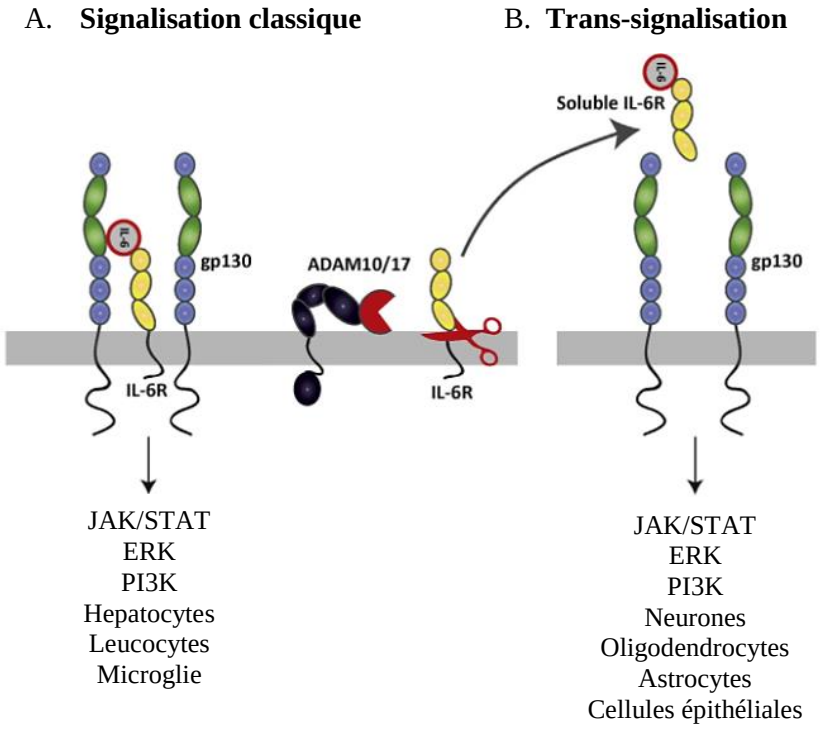


Figure 5 : Voie de signalisation classique et voie de trans-signalisation de l'IL-6.

(A) Dans la signalisation classique, la liaison de l'IL-6 au récepteur lié à la membrane IL-6R provoque la dimérisation de son récepteur β gp130, ce qui conduit à une signalisation JAK/STAT en aval dans un sous-ensemble restreint de cellules. L'élimination de l'IL-6R par les ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) conduit à la libération de sIL-6R qui peut se lier à l'IL-6 libre. (B) Ce complexe peut ensuite déclencher une signalisation JAK/STAT dans les cellules distales qui expriment la gp130 mais qui manquent de l'IL-6R lié à la membrane dans un processus appelé trans-signaling. D'après (Rothaug et al., 2016).

Dans la MA, l'IL-6 est retrouvée en grande concentration et favorise également la phosphorylation de la protéine tau via la voie MAPK (Querfurth & LaFerla, 2010).

L'IL-10, est l'une des principales cytokines anti-inflammatoires jouant un rôle important dans l'homéostasie neuronale et la survie cellulaire. Une exposition des cellules microgliales à l'IL-10 permet d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires induites par les peptides Aβ (Szczepanik *et al.,* 2001). Cependant, l'IL-10 ne permet ni de supprimer le dépôt de peptides Aβ ni d'induire la dégradation des peptides $A\beta_{1-42}$. C'est ce que montre l'étude réalisée par Leung et ses collaborateurs, où des patients atteints de MCI avec une atrophie cérébrale présentent de l'IL-10 au niveau systémique (Leung *et al.,* 2013).

Le TGF-β (*Transforming Growth Factor β*) est une cytokine produite par plusieurs types cellulaires, dont les astrocytes et les neurones, et joue un rôle important dans le développement du cerveau, de la synaptogenèse, des fonctions synaptiques, de la neurogenèse et de la neuroprotection (Flanders *et al.,* 1991; Heupel *et al.,* 2008; Mathieu *et al*., 2010). Lors d'une neuroinflammation, cette cytokine régule l'activation microgliale en diminuant la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNF-*α* (Makwana *et al.,* 2007). Toutefois, en cas d'activation prolongée, la microglie initialement protectrice devient moins sensible au TGF- β, ce qui conduit à une cytotoxicité exacerbée et à une diminution de la dégradation de peptides Aβ (von Bernhardi & Eugenín, 2004; Ramírez, 2008).

Les chémokines quant à elles, sont des molécules importantes pour le recrutement des cellules immunitaires, notamment la microglie, sur le site inflammatoire. Ces molécules largement exprimées dans le SNC exercent leurs fonctions par le biais de récepteurs de chémokines qui appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Rossi & Zlotnik, 2000). A l'instar des cytokines, il est possible de retrouver des chémokines pro-inflammatoires comme MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) et des chémokines anti-inflammatoires. Dans la MA, de fortes concentrations de chémokines ont été retrouvées dans le plasma, le LCS et le tissu cérébral des patients comme par exemple CCL2 ou encore CXCL8. Les chémokines, produites par la microglie, les astrocytes et les neurones ainsi que leurs récepteurs contribuent à la composante neuroinflammatoire via le recrutement des monocytes périphériques et en favorisant l'activation des cellules gliales (Liu *et al.,* 2014).

3. Barrière hématoencéphalique

La barrière hématoencéphalique (BHE) forme une interface physique et métabolique entre le compartiment cérébral et sanguin. Elle est formée par les cellules endothéliales tapissant les micro-vaisseaux cérébraux (*Figure 6*). La BHE régule l'entrée des composants plasmatiques et des leucocytes dans le SNC, et assure l'exportation de molécules potentiellement neurotoxiques du cerveau vers le sang (Abbott *et al.*, 2010 ; Zlokovic, 2008 ; 2011). La barrière physique est principalement assurée par les jonctions serrées entre les cellules endothéliales qui réduisent la perméabilité paracellulaire (Abbott *et al.*, 2010).

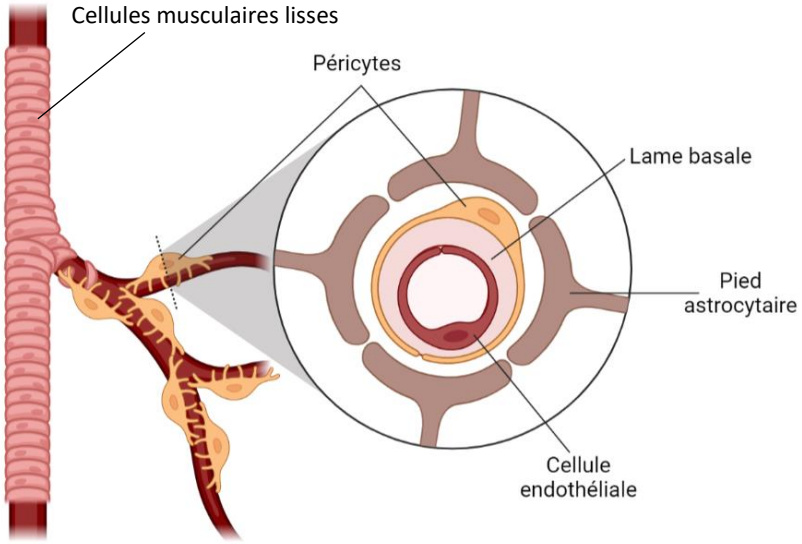


Figure 6 : Représentation schématique en coupe transversale d'un capillaire cérébral.

Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales constituent le lit de la barrière entre les vaisseaux sanguins et le parenchyme cérébral. Les cellules endothéliales sont liées par des jonctions serrées, étroitement entourées de péricytes et de la lame basale. Les prolongements des pieds terminaux des astrocytes soutiennent les fonctions endothéliales et assurent le lien cellulaire avec les cellules neuronales. Figure réalisée avec BioRender.

Les cellules endothéliales des micro-vaisseaux cérébraux (CEMC) ont des pôles membranaires luminaux (apical) et abluminaux (basolatéral) distincts régulant l'intégrité physique et fonctionnelle de la BHE (Daneman & Prat, 2015). Les CEMC soutiennent ainsi les trois fonctions essentielles de la BHE (Daneman & Prat, 2015) :

- du côté apical, la membrane entre les cellules endothéliales du SNC ne laisse diffuser de manière paracellulaire que les petites molécules hydrophiles et les ions (Brightman & Reese 1969),

- les récepteurs/canaux passifs et actifs sur les surfaces luminales et/ou abluminales régulent le transport des macromolécules et des protéines dans et hors du cerveau (Saunders *et al.*, 2013; Xiao & Gan, 2013),
- et de manière générale, les CEMC servent d'interface de communication entre le SNC et la périphérie, notamment en régulant l'entrée des cellules circulantes du système immunitaire dans le microenvironnement cérébral (Ransohoff & Engelhardt, 2012).

Des dysfonctionnements de la BHE conduisent principalement au passage de substances circulantes du sang au SNC ou à l'accumulation de toxines dans le SNC (Zlokovic, 2008). Les altérations de la BHE, comme une altération de l'expression de protéines ou de récepteurs ou encore de transporteurs par les cellules de l'unité neurovasculaire, peuvent favoriser une inflammation, le stress oxydant et des dommages neuronaux (Deane & Zlokovic, 2007; Zlokovic, 2011).

Plusieurs études ont montré que les patients atteints de la MA présentaient une modification des jonctions serrées conduisant à une altération de la perméabilité et/ou de l'intégrité de la BHE, causée par l'accumulation de peptides Aβ (Kook *et al.*, 2012; Marco & Skaper, 2006). Les études *in vitro*, plus nombreuses, relatent d'une modification de l'expression protéique des jonctions serrées en présence de peptides $A\beta_{1-42}$ (claudine 1 et 5 et Zonula Occludens ou ZO-1/2) ou encore d'une redistribution de ces dernières dans le cytoplasme des cellules (Kook *et al.*, 2012; Marco & Skaper, 2006). De plus, le peptide Aβ est toxique pour les cellules endothéliales du cerveau *in vitro* en raison de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui finissent par altérer les jonctions serrées et réduisent l'intégrité de la BHE (Carrano *et al.*, 2012). Une étude *in vivo* réalisée par Kook et ses collaborateurs chez la souris 5xFAD (un modèle de MA présentant une accumulation massive de peptides Aβ dans le cerveau aux premiers stades de la maladie), a montré que la structure tubulaire des capillaires cérébraux chez ces souris était altérée à proximité des dépôts de peptides Aβ (Kook *et al.*, 2012).

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que le réseau vasculaire cérébral des patients atteints de la MA présente une altération des systèmes de transport de la BHE, comparativement aux sujets témoins du même âge (Zlokovic, 2008). Les peptides Aβ sont transportés au travers des CEMC vers et depuis le cerveau via un transport actif. Les CEMC expriment en effet les transporteurs *low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) ainsi que les *receptor for advanced glycation end-products* (RAGE) responsables respectivement de l'efflux de peptides Aβ du cerveau vers la périphérie et de l'afflux de peptides Aβ dans le SNC (Deane & Zlokovic, 2004; Pflanzner *et al.*, 2010). Lorsque l'expression des transporteurs de peptides Aβ

est altérée, c'est-à-dire, lorsque l'afflux de peptides Aβ est plus important et/ou sa clairance diminuée, ceci contribue à l'accumulation de peptides Aβ au niveau du SNC (Zlokovic *et al.*, 2010). Dans la MA, des études cliniques ont mis en évidence des niveaux d'expression plus faibles de LRP1 et plus élevés de RAGE, ce qui favoriserait l'accumulation de peptides Aβ dans le parenchyme cérébral (Deane *et al.*, 2012; Zlokovic, 2008). Une étude expérimentale réalisée par Storck et ses collaborateurs sur des souris 5xFAD dépourvues du récepteur LRP1 a montré des niveaux plasmatiques de peptides $A\beta_{1-42}$ beaucoup plus faibles, contrairement aux niveaux de peptides Aβ solubles dans le cerveau qui eux, étaient augmentés (Storck *et al.*, 2016). De plus, les mécanismes de dégradation des peptides Aβ cérébraux impliquant la protéase néprilysine exprimée par les CEMC seraient également moins efficaces lors de la maladie, ce qui contribuerait aussi à l'accumulation cérébrale de ces peptides (Carpentier *et al.*, 2002). L'accumulation cérébrale et les dépôts de peptides Aβ induiraient alors les activations microgliale et astrocytaire ainsi que la transmigration de monocytes du compartiment sanguin vers le parenchyme cérébral ce qui aurait pour effet d'exacerber la réponse inflammatoire. En effet, une étude *in vitro* avec un modèle de BHE humaine a montré que le peptide Aβ induit la différenciation de monocytes en macrophages ainsi que la sécrétion de cytokines inflammatoires et de chémokines (Fiala *et al.*, 1998). Une autre étude sur des CEMC de rat a montré que le TNF-α seul ou en association avec l'IFN-γ ainsi que l'IL-1β induit une altération de la perméabilité de la BHE (de Vries *et al.*, 1996). Ainsi, ces travaux suggèrent que l'accumulation de peptides Aβ serait un élément précoce causant par la suite des altérations cérébrovasculaires et que la BHE pourrait être un acteur majeur dans l'initiation et/ou la progression de la MA (Bell & Zlokovic, 2009).

4. Stress oxydant central et périphérique

a. Le stress oxydant

Le stress oxydant englobe une variété de molécules et de radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), précurseur de la plupart des ROS et médiateur dans les réactions en chaîne du stress oxydant, ou encore le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), l'un des oxydants retrouvés dans la nature. Les ROS constituent les principaux acteurs du stress oxydant, notamment lorsque les défenses antioxydantes se retrouvent limitées. Lorsque la concentration en ROS augmente, cela entraîne des réactions en chaîne induites par les radicaux libres qui ciblent indistinctement les lipides, l'ADN ou encore les protéines (Kaur & Halliwell,

1994; Rubbo *et al*., 1994). La production endogène de ROS a été longtemps considérée comme restreinte à la mitochondrie. En effet, la première source endogène de ROS identifiée est la respiration aérobie, lors de laquelle l'O_2 est réduit en H_2O à la fin de la chaîne respiratoire mitochondriale (*Figure 7A, p.45*). Cependant des pertes d'électrons peuvent avoir lieu, et peuvent mener à la réduction partielle d'O_2 en $O_2^{\bullet -}$, ce dernier pouvant être dismuté en peroxyde d'oxygène H_2O_2. Bien que le peroxyde d'hydrogène ne soit pas en soi un radical mais une molécule, il est lui-même toxique et capable de donner naissance, via des réactions de type « réaction de Fenton », à la plus délétère des espèces radicalaires du stress oxydant, le radical hydroxyle OH• (*Figure 7B, p.45*). Il existe d'autres sources dont les réactions biologiques peuvent générer des ROS, comme le cytochrome P-450, ou les peroxysomes (Schlezinger *et al.,* 2002), mais la NADPH Oxydase (NOX) possède comme principal rôle, la production de ROS. La NOX est située dans diverses membranes cellulaires, notamment les polynucléaires, les macrophages et les cellules endothéliales (Babior, 2000a & 2000b). La première NOX a été identifiée dans les phagocytes (NOX2) est impliquée dans la défense immunitaire. Depuis, six autres homologues de la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase de phagocyte ont été identifiées et appelées : la NOX1, la NOX3, la NOX4, la NOX5 et DUOX 1 et 2 (*Dual Oxydase* car présentent une double homologie avec les NADPH oxydases et peroxydases).

Les mitochondries ont également la capacité de réguler la concentration d'$O_2^{\bullet -}$ à l'état d'équilibre dans l'espace intermembranaire par trois mécanismes différents :

- l'enzyme superoxyde dismutase (SOD), dismute l'O_2 et produit du peroxyde d'hydrogène (Corvo *et al.,* 2015),
- le cytochrome c (cyt c) de l'espace intermembranaire peut réduire $O_2^{\bullet -}$ afin de réintégrer l'oxygène dans le processus (Masarone *et al.,* 2018),
- la mitochondrie possède également une variété d'enzymes de réparation de l'ADN qui corrigent les erreurs résultant des dommages causés par l'O_2 (Turrens, 2003).

En conditions normales, il existe un équilibre entre la formation de ROS et le système antioxydant. Cet équilibre est rompu lors de plusieurs scénarios pathologiques dans lesquels les défenses antioxydantes deviennent insuffisantes ou saturées, entraînant un stress oxydant aboutissant souvent à l'apoptose (Hoeberichts & Woltering, 2003).

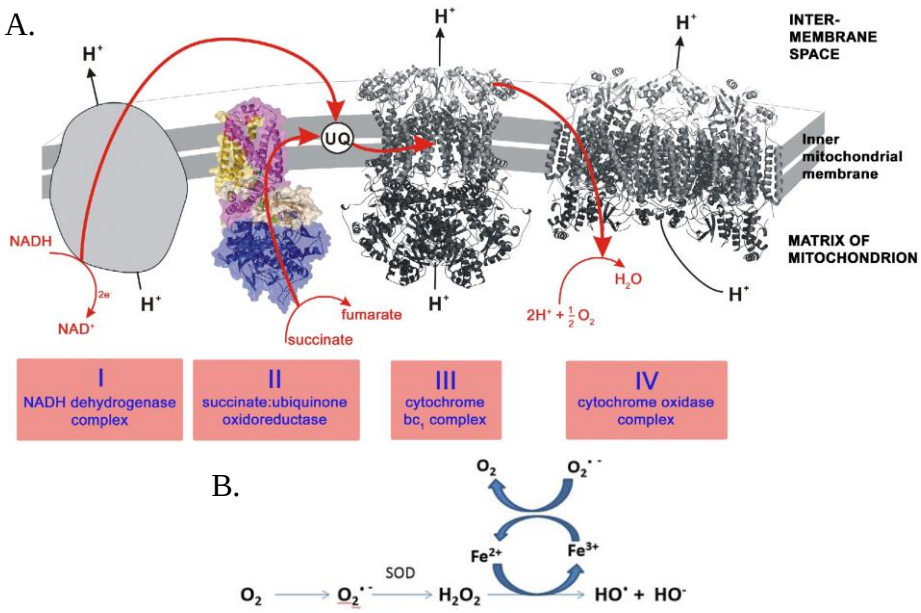


Figure 7 : Chaîne respiratoire de la mitochondrie (A) et Réaction de Fenton (B).

(A)Les lignes rouges représentent le transfert d'électrons. Le complexe I oxyde le NADH en NAD+ et par réduction produit de l'UQ appelé ubiquinone, et pompe des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le complexe II quant à lui, oxyde le succinate en fumarate et produit également de l'UQ par réduction. Le complexe III permet l'oxydation du UQ en coenzyme Q, réduit le cytochrome c ferrique en cytochrome c ferreux et pompe des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le complexe IV va ensuite oxyder le cytochrome c ferreux en cytochrome c ferrique, réduire l'oxygène en eau et pompe des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. L'UQ est nécessaire au transport d'électrons des complexes I à III. D'après Sun et al., 2005. (B) SOD : Sodium oxyde dismutase. D'après Latunde-Dada et al., 2017.

b. Rôle du stress oxydant dans la maladie d'Alzheimer

Les patients Alzheimer présentent une étendue significative de dommages oxydatifs associés à l'accumulation de peptides Aβ et aux DNFs (Christen, 2000). Dans la littérature, de plus en plus de preuves suggèrent un rôle important joué par les biométaux, notamment le fer, le zinc et le cuivre, dans le stress oxydant et la neurodégénérescence de la MA (Kozlowski *et al.*, 2009). En accord avec ces découvertes, des sites de liaison à haute affinité pour le cuivre et le zinc sur le peptide Aβ et l'APP ont été mis en évidence (Barnham *et al.*, 2003; Cuajungco & Fagét, 2003; Miura *et al.*, 2000). Le cuivre est un puissant médiateur du radical hydroxyle (OH•), retrouvé en grande concentration dans les plaques amyloïdes, qui de ce fait, contribue à l'augmentation du stress oxydant caractéristique du cerveau de patients atteints de la MA (Strozyk *et al*., 2009; Valko *et al*., 2005). Ce phénomène semble être associé à la longueur des fragments des peptides Aβ puisque l'$A\beta_{1-42}$ est plus toxique que l'$A\beta_{1-40}$, il est le candidat le plus susceptible de générer du H_2O_2 et d'autres ROS (Butterfield, 2002).

Le zinc a été retrouvé en forte concentration dans différentes régions cognitives dont le néocortex, l'amygdale et les hippocampes, qui sont principalement touchés dans la pathologie

Alzheimer (Huang *et al.*, 2004). De plus, le zinc peut se lier au peptide $A\beta_{1-40}$, conduisant à son agrégation sous forme toxique et fibrillaire. La réponse inflammatoire engendrée par les plaques de peptides Aβ non solubles est associée quant à elle, à une perturbation de l'homéostasie du zinc suivie d'une libération cérébrale incontrôlée de zinc, typique du stress oxydatif (Pal *et al.*, 2013). Ainsi, l'accumulation incontrôlée de zinc et/ou de peptides Aβ entraîne un stress oxydant et une cytotoxicité induits par le zinc et médiés par les peptides Aβ (Pal *et al.*, 2013).

Le cerveau est un organe particulièrement vulnérable aux attaques des radicaux libres. Les doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (AGPIs), composant les phospholipides de la membrane réagissent avec les ions hydrogènes (Tsaluchidu *et al.*, 2008), ce qui conduit à la peroxydation lipidique, une caractéristique importante dans la neurodégénération de la MA (Markesbery, 1997). De plus, l'oxydation des protéines par les radicaux libres peut entraîner des répercussions importantes dans la MA, car l'oxydation des protéines cérébrales peut affecter les enzymes essentielles aux fonctions neuronales et gliales. C'est le cas par exemple de la glutamine synthétase, particulièrement sensible à la modification oxydative. La diminution de cette enzyme dans les cerveaux de patients Alzheimer conduit à l'augmentation de l'excitotoxicité dans la MA (Butterfield *et al.*, 1997). L'agrégation pathologique de la protéine tau est liée à l'oxydation par la voie de la protéine kinase associée aux microtubules et par l'activation du facteur de transcription NF-κB (Markesbery, 1999). L'oxydation des protéines peut également conduire à la production d'AGE (produits finaux de glycation) lorsque le groupe amino- des protéines réagit de manière non enzymatique avec les monosaccharides (Dawnay & Millar, 1997).

Ainsi, la surproduction de ROS entraînant un stress oxydant peut avoir un effet délétère et peut être un médiateur important des dommages aux structures cellulaires et, par conséquent, de divers états pathologiques et du vieillissement.

c. *Le D-galactose : vers un nouveau modèle expérimental de la maladie d'Alzheimer*

Le D-galactose est un sucre réducteur présent dans de nombreux aliments tels que le fromage, les betteraves, le miel, le yaourt, le lait, le beurre, les kiwis, les prunes, la sauce soja, les cerises et le céleri (Acosta & Gross, 1995). Lorsque le D-galactose atteint la lumière intestinale, il est transporté par les cotransporteurs du glucose dépendant du sodium de type 1 (SGLT-1) jusque dans les cellules intestinales. Il quitte ensuite ces cellules par le transporteur du glucose de type 2 (GLUT-2), puis pénètre dans la circulation sanguine (Bjelakovic *et al.*, 2010). En conditions normales, la galactokinase et l'uridyl transférase, ont la capacité de

métaboliser le D-galactose en glucose, afin que ce dernier puisse entrer dans la voie de la glycolyse ou être stocké sous forme de glycogène dans le foie, le tissus adipeux et les muscles (Coelho *et al.*, 2015) (*Figure 8*). Le passage du D-galactose au travers de la BHE jusque dans le cerveau se fait au moyen du transporteur du glucose de type 1 (GLUT-1) (Cura & Carruthers, 2012) (*Figure 8*).

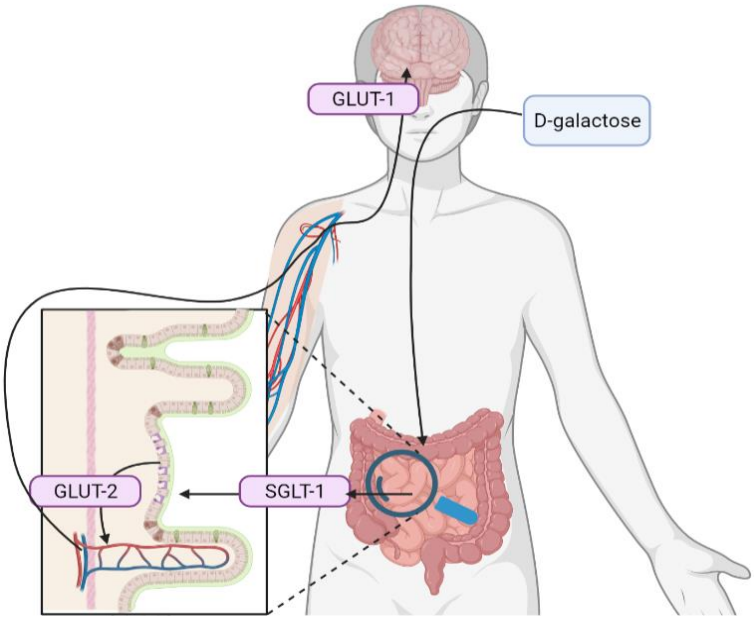


Figure 8 : Transport du D-galactose de l'ingestion jusqu'au cerveau.

Figure réalisée avec BioRender.

Une concentration normale de D-galactose dans le sang est inférieure à 10 mg/dL (Berry, 1993). Chez un adulte en bonne santé, la dose quotidienne maximale recommandée est de 50 g de galactose dont la majeure partie peut être éliminée de l'organisme dans les 8 heures après ingestion (Morava, 2014). Cependant, une trop grande ingestion de D-galactose peut aboutir à la génération de ROS à l'origine d'un dysfonctionnement mitochondrial, une inflammation, un stress oxydant ainsi que l'apoptose des cellules neuronales (pour revue voir Shwe *et al.*, 2018 ; *Tableau 2 p.51*). A partir de ces observations, le modèle d'administration (sous cutanée, intrapéritonéale ou *per os*) chronique de D-galactose représente un modèle d'étude pertinent pour les pathologies associées à l'âge telles que la MA, conduisant à une augmentation de marqueurs de vieillissement tels que les AGE, RAGE, aldose réductase, sorbitol déshydrogénase, BACE-1, peptide $A\beta_{1-42}$, ou encore de gènes associés à la sénescence (p16, p21, p53, p19Arf, p21Cip1/Waf1) (*Tableau 2 p.51*). Outre la présence de marqueurs de vieillissement, plusieurs études expérimentales chez le rat ou la souris ont montré qu'un apport chronique de D-galactose provoque une détérioration de la fonction cognitive liée aux

symptômes du vieillissement cérébral, conduisant de ce fait à l'utilisation de ce modèle chez le rongeur (Budni *et al.,* 2016 ; Chogtu *et al.,* 2018; Garcez *et al.,* 2018 ; *Tableau 2 p.51*). Les mécanismes sous-jacents de ce modèle sont liés à une augmentation du stress oxydant et à un dysfonctionnement mitochondrial.

Plusieurs études tendent à montrer que le mécanisme du stress oxydant induit par le D-galactose se produit à un niveau subcellulaire, en particulier dans les mitochondries cérébrales (pour revue voir Shwe *et al.,* 2018). Lorsque la concentration de D-galactose dépasse les concentrations normales, ce dernier est oxydé par le galactose oxydase pour former du H_2O_2, entraînant une diminution de la SOD (pour revue voir Shwe *et al.,* 2018). L'augmentation de H_2O_2 réagit avec une forme réduite de fer pour former des ions hydroxyde (OH^-). Le H_2O_2 et l'OH^- sont tous deux des ROS et, avec d'autres, peuvent provoquer une peroxydation lipidique dans les membranes cellulaires et altérer l'homéostasie redox, entraînant des dommages neuronaux (Hsieh *et al.,* 2009). De plus, le D-galactose a la capacité de réagir avec les groupements amines des protéines afin de former un composé instable (appelé produit de base de Schiff) qui subit plusieurs réactions sur une période de plusieurs jours pour former un composé plus stable connu sous le nom de produit d'Amadori (pour revue voir Shwe *et al.,* 2018). Ce produit Amadori se convertit de manière irréversible en AGE au fil des mois/années (Hsieh *et al.,* 2009) et lorsque l'AGE se lie à son récepteur RAGE, cela stimule la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase et engendre la production de ROS qui conduit à des dommages neuronaux et un dysfonctionnement cognitif (Hsieh *et al.,* 2009).

De plus, le D-galactose peut également être réduit par l'aldose réductase dans le but de former du galactitol qui s'accumule, ce qui provoque un stress osmotique et réduit l'activité de la chaîne de transport d'électrons dans les mitochondries. Ceci entraîne par la suite une augmentation de la production de ROS (Hsieh *et al.,* 2009). D'autres marqueurs du stress oxydant ont été mis en évidence dans le modèle D-galactose tels que le malondialdéhyde (MDA), le niveau de nitrite ou encore l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS). En ce qui concerne la réduction des enzymes de la chaîne respiratoire dans ce modèle, quatre des études ont montré que toutes les enzymes des complexes de la chaîne respiratoire telles que la NADH-co Q oxydoréductase (I), la succinate-co Q oxydoréductase (II), la co Q-cytochrome C oxydoréductase (III), la cyt c oxydase (IV) ont été endommagées en conséquence d'injection de D-galactose (pour revue voir Shwe *et al.,* 2018 ; *Tableau 2 p.51*). Plusieurs études ont également décrit que le D-galactose induisait des mutations de l'ADN mitochondrial cérébral à travers : 1- une diminution des enzymes de réparation de l'ADN, et 2- une délétion de l'ADN

mitochondrial et une altération des structures mitochondriales via la voie NOX-dépendant (pour revue voir Shwe *et al.*, 2018).

Fait intéressant, le D-galactose a également entraîné une diminution des enzymes antioxydantes telles que le glutathion, la catalase, la SOD, l'activité de la glutathion-S-transférase, la glutathion peroxydase et la capacité antioxydante totale. Par conséquent, le déséquilibre entre les ROS et les activités antioxydantes dans les modèles de vieillissement induits par le D-galactose entraîne une augmentation du stress oxydant et un dysfonctionnement mitochondrial, qui sont importants dans le processus de vieillissement. Toutes ces données suggèrent que le dysfonctionnement mitochondrial induit par le D-galactose, mis en évidence par une réduction des enzymes de la chaîne respiratoire et de l'activité antioxydante, augmente le stress oxydant, les mutations de l'ADN des mitochondries, le déclin de la synthèse d'ATP (adénosine triphosphate) et provoque une altération des structures mitochondriales.

L'action du D-galactose passe par l'activation des voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose. La voie extrinsèque active directement les caspases effectrices via JNK et converge avec la voie apoptotique intrinsèque au niveau de la mitochondrie (Benn & Wolf, 2004). Il a été constaté que le D-galactose activait la JNK et augmentait le niveau du complexe cyt c qui stimulait l'activation de la caspase-3, des caspases-9 et de la poly ADP ribose polymérase (PARP) (Shwe *et al.*, 2018). De plus, le D-galactose a déclenché la libération de cyt c par les mitochondries, réduit le niveau d'expression anti-apoptotique de l'oncoprotéine Bcl2 et augmente l'apoptose par la protéine pro-apoptotique Bax (*Bcl-2–associated X protein*). Tous ces événements suggèrent que le D-galactose favorise le processus apoptotique. En plus de l'apoptose, le D-galactose favorise aussi la neuroinflammation et la neurodégénérescence (Shwe *et al.*, 2018). D'après la littérature, la dose à partir de laquelle le D-galactose commence à induire l'apoptose est de 100 mg à 500 $mg.kg^{-1}.jour^{-1}$, avec une durée de 6 à 9 semaines (*Tableau 2 p.51*).

Les marqueurs biologiques utilisés pour suivre l'inflammation dans le modèle de vieillissement induit par le D-galactose sont en général COX-2, iNOS, NOS-2 (*nitric oxyde synthase-2*), le TNF-α, l'IL-1β ou encore l'IL-6. Le D-galactose augmente les marqueurs inflammatoires et neuroinflammatoires via l'activation du facteur de transcription NF-κB entraînant des troubles de la mémoire. D'après la littérature, le D-galactose commence à induire une inflammation à une dose de 50 à 180 $mg.kg^{-1}.jour^{-1}$ avec une durée d'administration de 6 à 9 semaines (*Tableau 2 p.51*). L'ensemble de ces éléments tendent à prouver que le D-galactose est à même d'induire un vieillissement accéléré du cerveau par l'intermédiaire du stress oxydant et d'un dysfonctionnement mitochondrial dans différentes régions du cerveau notamment les

hippocampes, le cortex cérébral, le cortex auditif et le noyau cochléaire ventral. Ce vieillissement cérébral induit par le D-galactose a été retrouvé dans différentes études utilisant des doses de D-galactose, de 100 $mg.kg^{-1}.jour^{-1}$ à 500 $mg.kg^{-1}.jour^{-1}$ après 6 à 8 semaines d'administration (pour revue voir Shwe *et al.*, 2018).

Le modèle de D-galactose constitue donc un modèle prometteur afin d'étudier le vieillissement et les pathologies liées à l'âge comme la MA ainsi que pour l'évaluation des effets de différentes approches thérapeutiques puisqu'il repose sur l'établissement d'un stress oxydant et d'une neuroinflammation tous deux observables dans la MA. De plus, ce modèle est moins invasif qu'un modèle d'injection cérébrale de peptides Aβ par exemple et s'apparente au contexte physiologique d'un organisme âgé dans lequel se développe la MA.

Tableau 2 : Synthèse d'études sur le D-galactose.

SOD: sodium oxyde dismutase ; GSH-Px: glutathion peroxydase; GSH : glutathion ; TBARS : Thiobarbituric Acid Reactive Susbtances ; TOC : total oxidant capacity; CAT : total antioxidant capacity; ROS : reactive oxygen species ; COX : cyclooxygenase ; AGE : advanced glycation endproducts ; RAGE : advanced glycation endproducts receptor; NO : nitric oxyde ; MDA : malondyaldéhyde.

Auteurs	Modèle	Administration D-galactose	Durée d'administration	Principaux résultats
Ho *et al.,* 2019	Souris C57B/CL6 mâle Mélange de probiotiques (Lactobacillus paracasei ssp. paracasei BCRC 12188, Lactobacillus plantarum BCRC 12251, and Streptococcus thermophilus BCRC13869) *per os*	100 mg/kg/jour de D-galactose en sous-cutané	12 semaines	↓ Performances dans la piscine de Morris ↑ MDA dans le plasma, cerveau et foie Réversé par les probiotiques
Jiang *et al.,* 2019	Souris ICR mâles Régime à 40% de lipides Huile de Krill à différentes concentrations *per os*	100 mg/kg/jour de D-galactose en sous-cutané	8 semaines	↓ Performances dans la piscine de Morris, réversée par l'huile de krill de manière dose dépendante ↓ Poids du cerveau dans le modèle D-galactose ↓ SOD et GSH-Px dans le sérum ↑ MDA dans le cerveau Restautration de 71 OTU du microbiote intestinal avec administration d'huile de krill
Zhao *et al.,* 2018	Souris BALB/c mâles agées de 8 semaines L. plantarum CCFM10 et RS15-3 *per os*	1,2 g/kg/jourde D-galactose en sous-cutané	8 semaines	↓ GSH, TOC et CAT dans le foie du modèle D-galactose ↑ Expression d'ARNm de la peroxiredoxine, GSH-Px, GSH-réductase et thioredoxine reductase dans le foie ↓ Lactobacilles et ↑ Clostridiales dans le microbiote des souris D-galactose
Lu *et al.,* 2010	Souris Kunming agées de 10 semaines	50 mg/kg/jour de D-galactose en injection sous cutanée	8 semaines	↓ Performances dans la piscine de Morris ↑ ROS, COX-2, iNOS, TNFα, IL-1β, IL-6, NF-κB, AGE, RAGE dans le cortex préfrontal
Yu *et al.,* 2015	Souris Kunming agées de 3 mois	180 mg/kg/jour en injection sous-cutanée	8 semaines	↓ Performances dans la piscine de Morris ↑ Augmentation des AGE, RAGE, AR, SDH, MDA dans le cerveau
Chen *et al.,* 2016	Souris Kunming agées de 3 mois	200 mg/kg/jour en injection intrapéritonéale	8 semaines	↓ Performances dans la piscine de Morris ↑ MDA, NOS, TNFα, IL-6, AGE, Ab1-42 dans l'hippocampe ↓ SOD, GSH-Px, BDNF dans l'hippocampe
Kumar *et al.,* 2009	Souris Swiss albinos agés de 2-3 mois Carvedilol 2,5 ou 5mg/kg/jour *per os*	100 mg/kg/jour en injection sous cutanée	6 semaines	Le Carvedilol réverse les éffets du D-galactose ↑ NADPH, SOD et glutathione ↓ MDA dans le cerveau
Yang *et al.,* 2016	Souris Kunming agées de 8-10 semaines	150 mg/kg/jour en injection sous cutanée	8 semaines	↓ Performances dans la piscine de Morris et open field ↑ MDA, NO, NF-κB, IL-1β ↓ GSH, SOD dans le cerveau
Ghanbari *et al.,* 2012	Souris Balb/B agées de 3 mois Administration intrapéritonéale de vitamine E (200mg/kg/jour), IMOD (20 mg/kg/jour) ou Angipars par gavage (2,1 mg/kg/jour) durant 4 semaines	500 mg/kg dans 10 mL d'eau de boisson	6 semaines	↑ Des lipides peroxydés ↓ Du pouvoir total anti-oxydant ↑ IL-1β, TNF-α, IL-6, NF-κB ↓ Testostérone
Fatemi *et al.,* 2018	Souris mâles de 22-27g Metformine 10 mg/kg dans 10 mL d'eau de boisson	500 mg/kg dans 10 mL d'eau de boisson	6 semaines	↑ Anxiété ↓ Capacité de reconnaissance d'un nouvel objet ↓ SOD et BDNF

Auteurs	Modèle	Administration D-galactose	Durée d'administration	Principaux résultats
Krzysztoforska *et al.,* 2019	Rats Sprague Dawley agés de 3 mois	100 mg/kg dans l'eau de boisson (100mg/mL)	2 semaines	↓ Performances dans la piscine de Morris ↓ Sérotonine et dopamine dans le cortex pré-frontal
Budni *et al.,* 2016	Rats males Wistar agés de 4 mois	100 mg/kg/jour de D-galactose *per os*	1, 2, 4, 6 ou 8 semaines	Altération de l'habituation à la nouveauté à partir de 4 semaines de D-galactose et altération de la mémoire spatiale après 6 semaines ↑ TBARS dans l'hippocampe et le préfrontal cortex
Chogtu *et al.,* 2018	Rats mâles Wistar Rivastigmine *per os*	200mg/kg/jour en sous-cutanée ou *per os*	8 semaines	↓ Performances dans la piscine de Morris à 2 semaines (retour à la condition contrôle après 8 semaines d'administration) Distance de nage plus altérée par l'oral que la sous-cutanée
Garcez *et al.,* 2018	Rats mâles Wistar agés de 2	Courbe dose-réponse 100, 200 ou 300 mg/kg/jour *per os*	4 semaines	Altération de la mémoire spatiale pour les trois doses de D-galactose La dose de 200 mg/kg/jour montre des altérations de la mémoire à court et long terme
Garcez *et al.,* 2018	Rats mâles Wistar agés de 2, 6 ou 16 mois	Administration de Butyrate de sodium (sous cutané, 600 mg/kg/jour à partir du 24ème jour) + 200 mg/kg/jour de D-galactose *per os*	4 semaines	Altération de la mémoire à court et long terme ↑ Activité des histones déacétylases dans le cortex frontal et l'hippocampe
Zu *et al.,* 2014	Rats Sprague Dawley agés de 3 mois	120 mg/kg/jour en injection sous-cutanée	8 semaines	↓ Performances dans la piscine de Morris ↑ Gènes associés à la sénescence, MDA, TNFα, IL-1β, IL-6, GFAP ↓ GSH, SOD, et neurogenèse de l'hippocampe
Rehman *et al.,* 2017	Rats Sprague Dawley agés de 3 mois	100 mg/kg/jour en injection sous-cutanée	7 semaines	↓ Performances dans la piscine de Morris et labyrinthe en Y ↑↓ BACE-1, RAGE, Ab, iNOS, TNFα, NF-κB, ROS, de marqueurs apoptotiques, GFAP, Iba1 dans le cerveau

III. Maladie d'Alzheimer : de l'intestin au cerveau

La MA est une maladie multifactorielle associée à divers facteurs de risque communs à d'autres pathologies. Il est difficile à l'heure actuelle d'incriminer avec certitude un facteur conduisant à l'accumulation de peptides Aβ et à l'hyperphosphorylation de la protéine tau. Toutefois, l'existence d'un stress oxydant, d'une inflammation chronique généralisée et/ou d'une dysbiose pourrait être des facteurs critiques dans cette pathologie. La littérature portant sur les maladies nutritionnelles chroniques (comme le diabète de type II et l'obésité) ou sur les altérations du microbiote intestinal soutiennent cette hypothèse, comme nous le développerons ci-dessous.

A. Maladie d'Alzheimer sporadique et pathologies nutritionnelles

1. Maladie d'Alzheimer et diabète

Les études réalisées durant ces 20 dernières années ont montré que les patients diabétiques présentent un risque accru de développer la MA, en comparaison avec les individus sains (Arvanitakis *et al.*, 2004). Ici, l'insuline et le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-1) interviendraient dans la plasticité synaptique et la consolidation de la mémoire à long terme en augmentant le métabolisme du glucose cérébral dans les régions importantes pour l'apprentissage et la mémoire, et notamment les hippocampes (Cholerton *et al.*, 2013). Ce mécanisme a été corroboré par des études réalisées sur des patients Alzheimer où une hyper-insulinémie et une hyper-glycémie ont été mises en évidence en lien avec le déclin cognitif (Luchsinger *et al.*, 2004; Razay & Wilcock, 1994).

L'hyper-insulinémie et l'insulino-résistance observées dans la MA aboutissent à la mise en place des deux phénomènes pathognomoniques princeps de la MA : l'accumulation intracérébrale de peptides Aβ et l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Baker *et al.*, 2011; Pugazhenthi *et al.*, 2017). En activant la voie de signalisation MAPK, elles augmentent l'expression de BACE-1 qui contribue à une hyper production de peptides Aβ et la formation de plaques amyloïdes. En effet, des études *in vitro* ont montré que l'insuline peut augmenter les niveaux de peptides Aβ extracellulaires en accélérant leur trafic au niveau du réticulum endoplasmique et du réseau trans-Golgi vers la membrane plasmique par inhibition de sa dégradation via une enzyme métalloprotéase dégradant l'insuline (Gasparini *et al.*, 2001; Pandini *et al.*, 2013).

L'hyperglycémie chronique provoque également l'activation de GSK3β (Jolivalt *et al.,* 2008) et une inhibition de la protéine phosphatase 2A (Gratuze *et al.,* 2017) qui conduisent toutes deux à une hyperphosphorylation de la protéine tau et la formation de faisceaux neurofibrillaires. L'hyperglycémie chronique augmente aussi les niveaux d'AGE qui résultent de la réaction non enzymatique entre le glucose et les groupes aminés libres dans les protéines, les acides nucléiques et les lipides, et leurs récepteurs à la surface des neurones et des cellules gliales (Sims-Robinson *et al.,* 2010). Une étude immunohistochimique réalisée par Sasaki et ses collaborateurs a montré que les AGE étaient fortement exprimés dans les plaques amyloïdes et les faisceaux neurofibrillaires dans le cerveau de patients Alzheimer (Sasaki *et al.,* 2001). La voie AGE/RAGE aboutit à une hyperphosphorylation de tau en activant GSK3 (Li *et al.,* 2012) et à l'augmentation de la production de peptides Aβ en stimulant l'expression de BACE-1 et d'APP par la voie NF-κB. Cette voie favorise également le clivage de l'APP par la voie amyloïdogénique et donc la formation de peptides Aβ (Yuzwa *et al.,* 2014). Le groupe de De Felice a indiqué que les oligomères de peptides Aβ peuvent inhiber la signalisation de l'insuline via la voie JNK/TNF-α, et de ce fait, inhiber sa fonction physiologique (Bomfim *et al.,* 2012; Clarke *et al.,* 2015). Par conséquent, un cercle vicieux existe entre la signalisation de l'insuline et les peptides Aβ qui peut encore aggraver la pathologie de la MA.

Le diabète de type II, caractérisé par un état de résistance à l'insuline, est associé à une activation du système immunitaire et donc à une augmentation de la concentration des marqueurs pro-inflammatoires. Plusieurs études s'accordent sur des niveaux élevés d'IL-6 et de protéine C réactive dans le sang de patients atteints de diabète de type II (Freeman *et al.,* 2002; Pradhan *et al.,* 2001). Or, une circulation périphérique de cytokines pro-inflammatoires majorerait le risque de démence et de MA (Koyama *et al.,* 2013), comme le montre les concentrations élevées de ces cytokines dans le plasma et le LCS de patients Alzheimer (Cacabelos *et al.,* 1991; Fillit *et al.,* 1991; Koivisto *et al.,* 2005). Outre une comorbidité élevée, la MA et le diabète de type II partagent des altérations du microbiote intestinal en rapport avec une inflammation systémique de bas grade. Des précisions sur ces interactions seront apportées dans la partie B intitulée « *Maladie d'Alzheimer et microbiote intestinal. Axe microbiote-intestin-cerveau* ». Aux vues de ces nombreuses occurrences, certains auteurs ont qualifié la MA de forme spécifique de diabète au niveau cérébral ou « diabète de type III » (Kandimalla *et al.,* 2017). Même si cette appellation reste discutée, l'ensemble des observations présentées ci-dessus indiquent une relation forte entre le diabète de type II et la MA et mettent en avant les mécanismes inflammatoires et liés à l'insuline.

2. Maladie d'Alzheimer et obésité

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), la prévalence du surpoids était estimée à 1,9 milliards d'adultes dans le monde pour l'année 2016, et parmi eux, plus de 650 millions sont classés comme obèses (WHO, 2020). En ce qui concerne la population infantile, on estime à 38,2 millions le nombre d'enfants de moins de 5 ans classé en surpoids ou en état d'obésité selon les données de 2019 (WHO, 2020). L'obésité se définie comme un déséquilibre entre l'apport calorique et les dépenses qui favorise l'accumulation de graisse dans les tissus adipeux et non adipeux. De plus, l'obésité est un facteur de risque considérable pour plusieurs maladies chroniques, notamment le diabète de type II, les démences, les complications gastro-intestinales et respiratoires, les maladies cardiovasculaires et certains types de cancers (Hakkak & Bell, 2017; Nameni *et al.*, 2017; Whitmer, 2007). L'augmentation de la prévalence de l'obésité parmi les groupes d'âge plus jeunes peut conduire à l'apparition plus précoce de la MA dans la population, qui est généralement considérée comme un trouble de la vieillesse (Naderali *et al*., 2009; Ogden *et al*., 2008).

Chez l'adulte, plusieurs études en imagerie cérébrale ont rapporté l'existence d'un lien entre une augmentation d'indice de masse corporelle (IMC) dans la quarantaine avec le risque futur de démence. Ces études ont montré une atrophie cérébrale ainsi que des lésions du SNC, une réduction du volume de matière grise et blanche du cerveau, une mort neuronale, une diminution de la plasticité synaptique, une altération de l'intégrité de la BHE et une déficience cognitive liées aux changements métaboliques (Droogsma *et al.*, 2015; Elias *et al*., 2012; Taki *et al.*, 2008).

Cependant, les liens entre le surpoids et le risque plus élevé de la MA restent encore mal compris mais l'inflammation pourrait jouer un rôle étant donné que les individus obèses présentent une inflammation systémique chronique de bas grade (Gregor & Hotamisligil, 2011). En effet, des études chez des personnes adultes en surpoids ou obèses ont montré des modifications dans les niveaux circulants de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β, l'IL-6, le MCP-1, le TNF-α et la protéine C réactive (Chen *et al.*, 2016a). Cela a également été observé chez des animaux nourris avec des régimes hyperlipidiques où les niveaux de cytokines pro-inflammatoires se sont retrouvés augmentés dans le plasma ou le sérum (Cortez *et al.*, 2013; Zhuang *et al.*, 2017). Ces augmentations d'acteurs de l'inflammation peuvent s'expliquer en partie chez les personnes obèses par la présence de triglycérides dans les tissus adipeux, capables de libérer des acides gras (AG) libres. Ces derniers favorisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires à partir du tissu adipeux et engendrent une inflammation systémique

chronique de bas grade (Alford *et al.,* 2018). Une fois dans le compartiment systémique, ces cytokines ont la possibilité de traverser la BHE et de favoriser le passage des leucocytes de la circulation sanguine dans le SNC. Une augmentation de la concentration en cytokines et en leucocytes dans le cerveau conduira à une dégradation de l'environnement cérébral et à une perte de fonctionnalité des synapses, un dysfonctionnement hypothalamique, une altération de la cognition et une neurodégénérescence (Amor *et al.,* 2010; Gregor & Hotamisligil, 2011; Martin-Jiménez *et al.,* 2017). Bien que le passage des AGs libres à partir de la BHE par diffusion passive soit limité, une étude réalisée avec de la TEP a montré que le cerveau possède également la capacité d'assimiler les AGs, avec une implication possible de l'albumine dans ce processus (Karmi *et al.,* 2010; Smith & Nagura, 2001). Une fois dans le tissu cérébral, les AGs à longue chaîne vont entretenir l'inflammation en participant à la génération de cytokines inflammatoires par l'activation des cellules locales (notamment la microglie) via les TLRs (*toll-like receptor*), des récepteurs membranaires clés dans les processus inflammatoires, et notamment le TLR4 (Gupta *et al.,* 2012).

Afin de comprendre la relation entre l'obésité et les fonctions cognitives, il est important de considérer le rôle de la leptine, une adipokine importante et produite principalement par les adipocytes proportionnellement à la masse de tissu adipeux (Blüher & Mantzoros, 2015). Cette hormone, aussi appelée « hormone de satiété », agit par l'intermédiaire de ses récepteurs présents dans le SNC, en particulier dans l'hypothalamus et le tronc cérébral, afin de réguler l'apport énergétique, le poids corporel, le comportement alimentaire tout en informant le cerveau sur la quantité de lipides accumulée dans les différents tissus de l'organisme (Ahima & Flier, 2000). Il a également été montré que la leptine peut *in vitro* diminuer la phosphorylation de la protéine tau dans les neurones corticaux et améliorer la pathologie cérébrale liée aux peptides Aβ et à la protéine tau (Greco *et al.,* 2008). En effet, dans les modèles murins de la MA, l'administration intrapéritonéale chronique de leptine augmente la neurogenèse dans les hippocampes en induisant la prolifération de cellules progénitrices et en atténuant la neurodégénérescence induite par les peptides Aβ (Calió *et al.,* 2021). De plus, la leptine possède des propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices confirmées dans un modèle de souris transgénique APP/PS1 (Pérez-González *et al.,* 2011).

Malgré ces effets bénéfiques pour l'organisme et le fait que la leptine soit impliquée dans la perte de poids, les cas typiques d'obésité chez l'homme montrent à l'inverse un niveau élevé de cette hormone, ce qui suggère des mécanismes de résistance à la leptine, encore très peu compris (Caro *et al.,* 1996; Koch *et al.,* 2013).

Ce contraste entre les observations de la leptine et son implication dans la perte de poids peut possiblement s'expliquer en partie par le fait que la leptine soit produite en périphérie par le tissu adipeux, ce qui nécessite de traverser la BHE (par un transport passif saturable) pour assurer ses nombreuses actions centrales (Caro *et al.*, 1996). Or, et malgré des concentrations systémiques de leptine élevées, les niveaux dans le LCS se sont révélés être plus faibles en cas d'obésité, suggérant par conséquent une altération du transport de la leptine au travers de la BHE et argumentant possiblement dans le sens d'une résistance à la leptine (Farr *et al.*, 2015).

Aux vues des propriétés physiologiques de la leptine, les mécanismes de résistance centrale de l'insuline et de la leptine observés chez les personnes en surpoids, confortent non seulement l'existence du lien entre obésité et processus cognitif, mais permettent également de considérer l'obésité comme un autre facteur de risque des troubles cognitifs et de la MA. Des modifications du microbiote intestinal, résumées sous le nom de dysbiose, peuvent également entrainer des troubles métaboliques, comme l'obésité et le diabète et se trouvent être liées à la MA. En ce sens, il a été décrit que les patients diabétiques présentent une dysbiose intestinale (Ejtahed *et al.*, 2020), qui contribue à l'apparition et au maintien de la résistance à l'insuline (Sircana *et al.*, 2018). De plus, les habitudes alimentaires peuvent influencer la composition du microbiote intestinal. Il a ainsi été montré qu'un régime occidental, c'est à dire un régime riche en graisses/sucre et un faible apport en fibres, favorise l'apparition d'une dysbiose et est associé à l'obésité et aux maladies métaboliques (Zinöcker & Lindseth, 2018). C'est pourquoi, la place du microbiote intestinal et plus précisément l'axe microbiote-intestin-cerveau et son intégration dans la physiopathologie de la MA seront décrites au sein de la partie suivante.

B. Maladie d'Alzheimer et microbiote intestinal : axe microbiote-intestin-cerveau

Jusqu'à récemment, le microbiote intestinal était considéré comme une barrière aux pathogènes impliquée dans des processus se déroulant exclusivement dans l'intestin, comme la fermentation des glucides, la synthèse de vitamines et le métabolisme xénobiotique. Le microbiote intestinal commence sa formation dès le début de la naissance et se diversifie au cours de la vie pour enfin s'appauvrir avec le vieillissement (*Figure 9, p.58*).

Il existe environ 1000 espèces et plus de 7000 souches de bactéries dans l'intestin humain parmi lesquelles les plus abondantes sont les *Firmicutes* (51%, englobant des bactéries Gram-positives et négatives comme *Lactobacillus*, *Eubacterium* et *Clostridium*) et les *Bacteroidetes* (48%, englobant des bactéries Gram-négatives telles que *Bacteroides* et

Prevotella) (Rup, 2012). Les 1% restants comprennent des *Proteobacteria*, des *Actinobacteria* (les *Bifidobacteriaceae* notamment) ou encore des *Fusobacteria* (Westfall *et al.*, 2017).

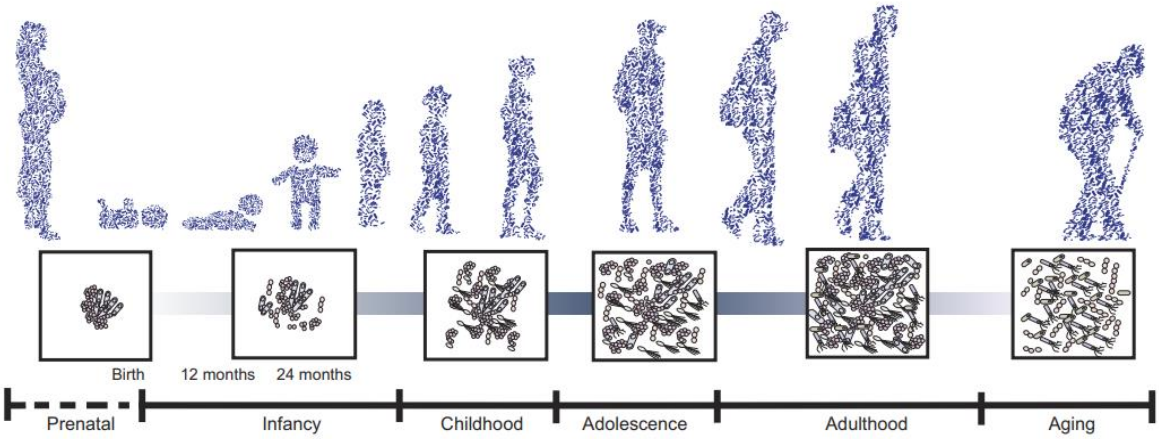


Figure 9 : Chronologie de la modification de diversité du microbiote intestinal en fonction de l'âge. D'après Cryan et al., 2019.

Durant ces quinze dernières années, les fonctions du microbiote ont été grandement revisitées par la communauté scientifique. La principale raison étant la mise en évidence d'un lien direct entre la densité et la composition des espèces du microbiote avec un certain nombre de pathologies telles que le diabète ou encore l'obésité, qui comme indiqué lors de la section précédente sont des facteurs de risques de la MA dans sa forme sporadique. Par ailleurs, un certain nombre de données bibliographiques montrent l'influence du microbiote intestinal sur les fonctions cérébrales (Westfall *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2017) au travers des interactions intestin-cerveau, et cela aux différents stades de vie d'un individu (Aarts *et al.*, 2017). Dans cette partie nous abordons donc les différents systèmes de communication entre le microbiote, l'intestin et le cerveau ainsi que les altérations de ces systèmes dans la MA qui seront synthétisés pour la plupart en *figure 13* présentée en *page 72* de ce manuscrit.

1. La communication nerveuse : le système nerveux autonome et entérique

Le système nerveux autonome (SNA), composé des systèmes nerveux sympathique, parasympathique et entérique (SNE), régule l'homéostasie physiologique de l'hôte. Le SNA a la capacité de moduler le SNC en contrôlant les fonctions du tractus gastro-intestinal (TGI)

(Mayer *et al.,* 2015). Les métabolites neuroactifs produits par le microbiote intestinal, tels que la sérotonine, le GABA, les catécholamines et les précurseurs du tryptophane peuvent interagir avec les récepteurs neuronaux de l'individu présents à la fois au niveau intestinal et central (Cryan *et al.,* 2020). Ainsi, l'étude de Goehler et ses collaborateurs a montré qu'une inoculation gastro-intestinale de *Campylobacter jejuni* (bactérie Gram-négative responsable de diarrhée chez les bovins et moutons) chez la souris provoquait une activation sensorielle vagale. Cette activation aboutit à une forte expression du marqueur d'activation neuronale c-fos au niveau des ganglions sensoriels et du noyau de relai sensoriel primaire du nerf vague (nerf crânien X) dans le tronc cérébral, reflétant le fait que la stimulation locale de l'intestin peut moduler l'activité cérébrale via les nerfs du SNA (Goehler *et al.,* 2005). Par ailleurs, plusieurs études précliniques utilisant la vagotomie ou la stimulation du nerf vague ont montré que la communication bidirectionnelle via le nerf vague est nécessaire au bon fonctionnement cérébral. Ainsi, une vagotomie conduit à une diminution de la prolifération et de la survie de nouvelles cellules, à une réduction de neurones immatures (O'Leary *et al.,* 2018) et à une activation de la microglie au niveau hippocampique (Ronchi *et al.,* 2012). La stimulation du nerf vague, initialement étudiée dans la dépression majeure, favorise la neurogenèse hippocampique et la sécrétion de neurotransmetteurs (noradrénaline, dopamine, sérotonine) dans les structures cérébrales impliquées dans l'anxiété et la dépression, comme le cortex orbitofrontal, l'amygdale et les hippocampes (Breit *et al.,* 2018). Cette stimulation entraine également l'expression hippocampique de BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) et peut directement modifier le comportement et améliorer le phénotype pseudo-dépressif des modèles animaux (Shin *et al.,* 2019).

Le SNE est localisé tout le long du tube digestif et est responsable des fonctions motrices et sécrétrices du TGI. Le SNE communique majoritairement avec le SNC au moyen du système nerveux parasympathique (principalement par le nerf vague) et le système sympathique (principalement par les ganglions pré-vertébraux). Les voies afférentes du SNE correspondent à l'innervation sensitive et permettent aux substances (lipopolysaccharide ou LPS, neuromédiateurs etc) de la lumière intestinale de moduler les fonctions du TGI ainsi que d'influencer, partiellement le SNC par l'intermédiaire des afférences vagales et des neurones du SNE (Cryan *et al.,* 2020). Par exemple, le microbiote peut moduler le développement et le fonctionnement du SNE au travers de l'activation des récepteur TLRs 2 et 4 (Hyland & Cryan, 2016). Ainsi, des modifications du SNE ont été retrouvées chez des souris déficientes en TLR4 qui résultent en une diminution du nombre de selles et de leur teneur en eau (Caputi *et al.,* 2017). En ce qui concerne le TLR2, des souris déficientes pour ce récepteur présentent une

altération de la motilité gastro-intestinale (Brun *et al.*, 2015). Une absence de microbiote, rendu possible en préclinique grâce à l'emploi de souris *germ free*, conduit à des altérations ultra-structurales (caractérisées par microscopie à haute résolution), fonctionnelles et neurochimiques du SNE en début de la période postnatale (Collins *et al.*, 2014). Des observations similaires ont été faites chez des souris présentant une dysbiose intestinale provoquée par des antibiotiques (Hyland & Cryan, 2016) ou déficientes en TLR (Caputi *et al.*, 2017).

2. La communication endocrinienne : l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) présenté en *figure 10* (*p.61*) constitue une des voies de communication importante entre l'intestin et le cerveau (Cryan *et al.*, 2019). L'axe HPA s'active à la suite d'un stress subit par l'organisme et a pour finalité la sécrétion de glucocorticoïdes (cortisol pour l'homme ou corticostérone pour les rongeurs) par les glandes surrénales afin d'induire une réponse de l'organisme. Grace à un rétrocontrôle négatif induit par les récepteurs aux glucocorticoïdes et aux minéralocorticoïdes au niveau du SNC, l'axe HPA s'autorégule et sa réponse est inhibée lorsqu'une concentration trop élevée de glucocorticoïdes est présente dans l'organisme.

Des modèles animaux expérimentaux basés sur l'application de stress chronique ont permis de mettre en évidence un lien entre l'activation de l'axe HPA et des altérations de la composition du microbiote et de ses métabolites. Ainsi, l'administration de compléments alimentaires tels que des fructooligosaccharides (FOS), des galactooligosaccharides (GOS) ou une combinaison de FOS et de GOS pendant 3 semaines, dans un modèle murin de stress chronique, conduit à une augmentation de l'acétate et du propionate (des acides gras à courte chaîne ou AGCCs) produite par le microbiote intestinal. L'administration de ces compléments a également diminué les niveaux de corticostérone dans le plasma ainsi que les comportements pseudo-dépressifs et anxieux des souris (Burokas *et al.*, 2017).

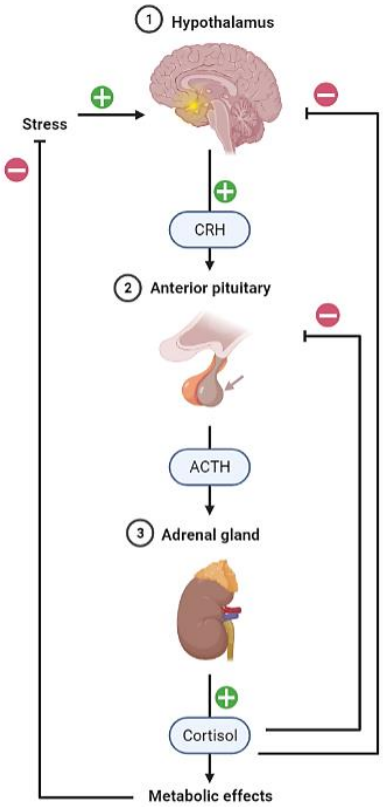


Figure 10 : Schéma de l'axe HPA.

L'axe HPA est composé du complexe hypothalamus, hypophyse et glandes surrénales qui, par l'intermédiaire d'une cascade hormonale (CRH libéré par l'hypothalamus et ACTH libéré par l'hypophyse) induit une libération par les glandes surrénales de cortisol ou corticostérone permettant d'inhiber la réaction au stress. Un rétrocontrôle négatif est exercé par le cortisol afin d'inhiber la libération de CRH et d'ACTH. CRH : corticolibérine ; ACTH : hormone adrénocorticotrope. Figure réalisée avec BioRender.

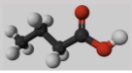
3. La communication chimique : les acides gras à chaine courte et les neurotransmetteurs

a. Les acides gras à chaine courte

De nombreuses études ont établi que les AGCCs produits par les bactéries intestinales régulent la physiologie et le fonctionnement du SNC de l'hôte (Cryan *et al.*, 2019). Les AGCCs sont issus du catabolisme des oligosaccharides alimentaires par les bactéries. La majorité des espèces du microbiote intestinal vont produire comme AGCC de l'acétate, mais il est possible de trouver également du propionate ou du butyrate, selon les espèces rencontrées et la voie de production (Louis & Flint, 2017 ; *Tableau 3*).

Tableau 3 : Capacité de production du butyrate et propionate par les espèces bactériennes dominantes dans le microbiote fécal humain.

Les différents phyla, familles et espèces majoritaires dans le microbiote fécal de sujets humains ainsi que leur capacité à synthétiser (+) ou non (-) le butyrate et le propionate sont représentés. Pour plus de clarté, les différentes voies par lesquelles sont produits ces AGCCs ne sont pas mentionnées (voir revue Louis & Flint 2017).

Phylum (famille)	Espèces	Butyrate 	Propionate
Bacteroidetes (Bacteroidaceae)	*Bacteroides uniformis*	-	+
	Bacteroides vulgatus	-	+
Bacteroidetes (Prevotellaceae)	*Prevotella copri*	-	+
Bacteroidetes (Rikenekkaceae)	*Alistipes putredinis*	-	+
Firmicutes (Lachnospiraceae)	*Eubacterium rectale*	+	-
	Roseburia inulinivorans	+	+
	Roseburia intestinalis	+	-
	Dorea longicatena	-	-
	Eubacterium hallii	+	+
	Anaerostipes hadrus	+	-
	Ruminococcus torques	-	-
	Coprococcus eutactus	+	-
	Blautia obeum	-	+
	Dorea formicigenerans	-	-
Firmicutes (Ruminococcaceae)	*Faecalibacterium prausnitzii*	+	-
	Subdoligranulum variabile	+	-
	Ruminococcus bromii	-	-
	Eubacterium siraeum	-	-
Firmicutes (Veillonellaceae)	*Dialister invisus*	-	+
Firmicutes (Acidaminococcaceae)	*Phascolarctobacterium succinatutens*	-	+
Firmicutes (Erysipelotrichaceae)	*Eubacterium biforme*	+	-
Actinobacteria (Bifidobacteriaceae)	*Bifidobacterium adolescentis*	-	-
	Bifidobacterium longum	-	-
Actinobacteria (Coriobacteriaceae)	*Collinsella aerofaciens*	-	-
Verrucomicrobia (Verrucomicrobiaceae)	*Akkermansia mucinphila*	-	+

Les AGCCs ont la capacité d'affecter le SNC et le comportement de l'hôte au travers de différents mécanismes moléculaires comme l'inhibition de l'histone deacétylase (jouant un rôle important dans l'expression génique), l'activation du nerf vague, l'induction de la signalisation entéro-endocrinienne ou encore au travers de propriétés anti-inflammatoires (Cryan *et al.*, 2019).

Parmi les différents représentants des AGCCs, le propionate et le butyrate peuvent inhiber l'activité des histones deacétylase conduisant à des modifications de l'expression génique et par la suite inhibent la formation de tumeurs et la signalisation inflammatoire dans différents tissus (Arpaia *et al.*, 2013). Les effets de ces deux AGCCs sont médiés par l'activation de RCPG 41 (exprimé fortement dans le colon et dans le tissu adipeux) et RCPG 43 (exprimé principalement par les cellules immunitaires) (Brown *et al.*, 2003a). Des études précliniques chez la souris ont analysées les effets d'une administration intrapéritonéale ou

sous-cutanée de très fortes doses de butyrate, ce qui a conduit à une augmentation de l'acétylation des histones et à une amélioration des capacités d'apprentissage et de mémoire des animaux (Kratsman *et al.*, 2016). En tant qu'AGCC, le butyrate représente également un ligand de faible affinité pour le RCPG 109A, exprimé de manière constitutive dans tout l'intestin. L'importance de ce récepteur, et son affinité avec le butyrate, résident dans sa propriété à bloquer la signalisation intracellulaire du facteur de transcription NF-κB (Thangaraju *et al.*, 2009).

Parmi les nombreuses cibles des AGCCs, on retrouve le facteur de transcription activé par un ligand : le récepteur *Aryl hydrocarbon* (AHR), qui par son activation, jouent un rôle crucial dans la régulation de l'inflammation et le maintien de la santé du TGI. Des études récentes menées *in vitro* ont montré que les AGCCs augmentent l'expression basale de gènes dépendants de ce facteur de transcription au sein de cellules Caco-2, lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale isolée d'un adénocarcinome colique (Jin *et al.*, 2017). Le butyrate ferait parti des ligands potentiels des AHRs et permettrait leur activation au sein des cellules épithéliales intestinales humaines (Marinelli *et al.*, 2019).

Une des autres propriétés des AGCCs est la régulation de la synthèse et de l'homéostasie intestinale de la sérotonine, un neuromédiateur du SNC et du tube digestif (Cryan *et al.*, 2019). Ces propriétés de régulation ont été montrées *in vitro*, dans des cellules entérochromaffines humaines (des cellules endocrines intestinales), où les AGCCs induisent la transcription de l'enzyme tryptophane hydroxylase 1 (TPH1, une enzyme participant à la production de sérotonine) (Reigstad *et al.*, 2015). Outre une fonction de synthèse et de régulation de la sérotonine, les AGCCs participent également à l'intégrité de la barrière intestinale. Cela a notamment été montré avec le butyrate puisque ce dernier est capable de renforcer la perméabilité intestinale en augmentant l'expression des protéines des jonctions serrées telles que l'occludine ou ZO-1 (Stevens *et al.*, 2018).

Outre la barrièrre intestinale, les AGCCs ont aussi des effets sur la BHE. L'utilisation de souris *germ free* a permis de poser un premier constat : l'absence de microbiote chez ces animaux résulte en une augmentation de la perméabilité de la BHE. Cette altération de perméabilité est principalement associée à une diminution de l'expression de l'occludine et de la claudine-5 mais également à une altération fonctionnelle des cellules immunitaires cérébrales : la microglie. Cela a pu être confirmé grâce à l'administration d'AGCCs qui permet de compenser les différentes altérations des souris *germ free* (Braniste *et al.*, 2014, Erny *et al.*, 2015). En effet, les AGCCs ont la capacité de traverser la BHE, par diffusion passive, directement depuis la circulation sanguine. Une fois dans le compartiment cérébral, les AGCCs

peuvent influencer le phénotype et les propriétés de la microglie en contrôlant leur maturation et leur fonction (Wang *et al.,* 2018). Ainsi, l'ajout de butyrate de sodium dans un modèle *in vitro* de microglie activée et l'administration chez un modèle de souris présentant une occlusion de l'artère cérébrale moyenne (modèle d'ischémie cérébrale), induit des effets neuroprotecteurs par diminution de l'activation microgliale, des médiateurs pro-inflammatoires et une augmentation des médiateurs anti-inflammatoires secrétés par la microglie activée (Patnala *et al.,* 2017). Par ailleurs, une administration par voie orale de butyrate dans un modèle porcin a permis d'augmenter la neurogenèse, la taille de la couche de cellules granulaires et a modifié le métabolisme du glucose dans les hippocampes (Val-Laillet *et al.,* 2018). Les effets bénéfiques du butyrate ont également été évalués au sein d'un modèle d'obésité : des souris *knock-out* pour le gène codant le récepteur des lipoprotéines de basse densité soumis à un régime chronique hyperlipidique. Ce modèle se caractérise notamment par une diminution du flux sanguin cérébral et une neuroinflammation, qui ont été contrebalancées par une supplémentation en butyrate (Arnoldussen *et al.,* 2017). L'ensemble de ces données portant sur le butyrate et les AGCCs, bien que principalement définit via des études précliniques, confirme l'implication du microbiote intestinal dans l'obésité et la MA.

b. Les neuromédiateurs

Différentes bactéries, retrouvées dans le microbiote intestinal, produisent des molécules à activité neuromédiatrice qui pourraient constituer une voie essentielle de communication entre l'hôte et le microbiote. A titre d'exemple, les bactéries du genre *Escherichia sp.,* sont connues pour synthétiser des catécholamines comme la noradrénaline (Shishov *et al.,* 2009) ainsi que du GABA (à l'instar de *Lactobacillus spp.*) (Siragusa *et al.,* 2007). Par ailleurs, le genre *Bacillus spp.* est connu comme étant capable de synthétiser de la dopamine et de la noradrénaline (Tsavkelova *et al.,* 2000). À ce jour, les mécanismes par lesquels les neuromédiateurs d'origine bactérienne affectent la physiologie de l'hôte, sont peu connus. Cependant, il a tout de même été montré que la noradrénaline produite par l'hôte peut aboutir à l'induction de gènes de virulence bactérienne à l'origine d'une infection (Lyte, 2014) ou encore que l'ajout de GABA à une culture de *Pseudomonas aeruginosa* permet d'accroitre la virulence des bactéries (Dagorn *et al.,* 2013). Des étude *in vitro* ont révélé que *L. reuteri* produit de l'histamine qui, au moyen de son interaction avec le récepteur de l'histamine H2, inhibe la production de TNF-α dans les cellules monocytoïdes humaines activées par le récepteur TLR2 (Thomas *et al.,* 2012). La continuité de ces études, basée sur l'évaluation de *L. saerimneri* dans

des recherches *in vitro* et précliniques, ont confirmé que l'histamine produite par le microbiote joue un rôle clé dans l'homéostasie immunitaire de l'hôte grâce à leur interaction avec leur récepteurs (Ferstl *et al.*, 2014).

Parmi les différents neuromédiateurs d'origine microbienne, la sérotonine demeure le messager chimique le plus étudié. C'est un neuromédiateur important synthétisé par la TPH-1 à partir de son précurseur, le tryptophane, dans les cellules entérochromaffines (Nakamura & Hasegawa, 2009). Une analyse fonctionnelle, réalisée *in vitro*, a permis de montrer que la mise en culture de bactéries comme *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus spp*. et *E. coli* retrouvés dans la flore fécale de *Ascaris suum* (nématode parasite chez le porc) présente une production de sérotonine (Roshchina, 2010). De même, une mise en co-culture de cellules entérochromaffines avec des micro-organismes issus de microbiote humain et murin (ou des AGCCs) stimule la formation de sérotonine par les cellules endocrines intestinales via l'augmentation de l'expression de la TPH-1 (Reigstad *et al.*, 2015; Yano *et al.*, 2015). La sérotonine d'origine bactérienne assure plusieurs fonctions chez l'hôte, notamment la motilité intestinale et la fonction plaquettaire (Reigstad *et al.*, 2015). L'importance du microbiote dans la synthèse des neuromédiateurs du compartiment intestinal a pu être confirmée grâce à la caractérisation des souris *germ free*, qui présentent une diminution des niveaux de sérotonine circulants mais également hippocampiques (Crumeyrolle-Arias *et al.*, 2014; Wikoff *et al.*, 2009). Ces données précliniques sous-entendent que le microbiote joue non seulement un rôle dans la synthèse de neuromédiateurs périphériques, qui peuvent à leur tour impacter le SNC.

c. Les dérivés du tryptophane

Le tryptophane, outre son rôle de précurseur de la sérotonine, fait également partie de la voie de synthèse de la kynurénine, un des nombreux métabolites du tryptophane, et dont l'accumulation dans le SNC se révèle neurotoxique. La transformation préférentielle du tryptophane en kynurénine est très étudiée dans la littérature, de par son implication majeure dans la neuroinflammation, et a été associée à de nombreux troubles neuropsychiatriques tels que la dépression majeure ou encore la MA (Cervenka *et al*., 2017; Wu *et al.*, 2013). Pour une meilleure compréhension, un schéma récapitulatif de l'ensemble du métabolisme du tryptophane en lien avec le microbiote intestinal est présenté en *figure 11* (*p.67*). Les enzymes intervenant dans le métabolisme du tryptophane en kynurénine (dont la tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO) et l'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO)) sont modulées en partie par les glucocorticoïdes et le système immunitaire (Ohta *et al.*, 2017; Platten *et al.*, 2019). Le

microbiote intestinal est également impliqué dans la synthèse de la kynurénine en modulant la production d'hormones corticoïdes et en favorisant les propriétés pro-inflammatoires du système immunitaire (Badawy, 2017; Strasser *et al.,* 2017).

Le microbiote est également capable de métaboliser l'indole (et ses métabolites) à partir du L-tryptophane dans la lumière intestinale. Ils ont la capacité d'agir comme ligand du récepteur nucléaire AHR, précédemment cité, et son activation joue un rôle important dans la réponse immunitaire et l'inhibition de l'inflammation dans le TGI (Agus *et al*., 2018; Hubbard *et al.,* 2015). Le AHR participe au maintien de l'homéostasie immunologique au travers du contrôle de la différenciation des cellules T, une catégorie de leucocyte principalement impliquée dans la réponse immunitaire adaptative, et le développement des cellules immunitaires Th17 (Kimura *et al.,* 2008; Mascanfroni *et al.,* 2015). L'activation des AHRs des cellules immunitaires aboutit à l'augmentation de l'IL-22 qui appartient à la famille de l'IL-10 (Monteleone *et al.,* 2011). Parmi ses différentes fonctions, l'indole améliore la fonction et la perméabilité de la barrière intestinale en augmentant l'expression des protéines de jonctions serrées (Shimada *et al.,* 2013). Par ailleurs, les dérivés d'indole, tels que l'indoxyl-3-sulfate, présents en périphérie peuvent traverser la BHE et activer l'AHR au niveau astrocytaire afin d'inhiber la voie NF-κB et supprimer la réponse pro-inflammatoire (Rothhammer *et al.,* 2016).

Enfin, le dérivé indole IPA (3-Indolepropionic acid) impacte également la perméabilité intestinale et l'inflammation du TGI. En effet, l'IPA agit comme un ligand du récepteur du prégnane X, un récepteur nucléaire impliqué dans la détoxification cellulaire, ce qui diminue la production de TNF-α des entérocytes tout en augmentant les taux d'ARNm codants pour les protéines jonctionnelles de la barrière intestinale (Venkatesh *et al.,* 2014). Des études *in vitro* ont aussi montré que l'IPA est un excellent piégeur de radicaux hydroxyles, ce qui protège les neurones des dommages oxydatifs et de la neurotoxicité des peptides Aβ (Chyan *et al.,* 1999), rappelant une fois de plus le lien très étroit entre le microbiote intestinal et la MA.

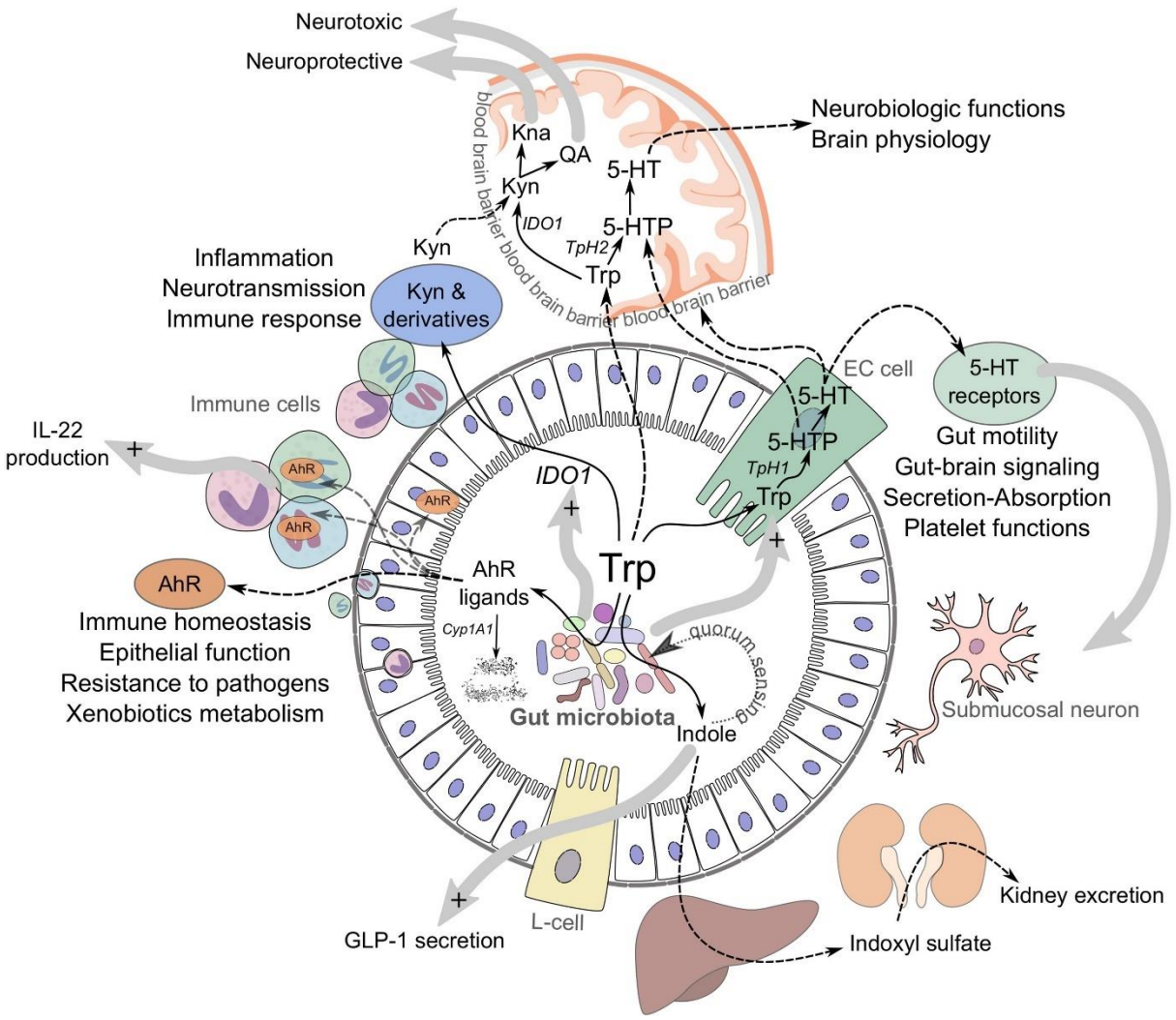


Figure 11 : Métabolisme du tryptophane par le microbiote intestinal de l'hôte en condition physiologique.

Le tryptophane alimentaire peut être directement converti par le microbiote intestinal en ligands des AHRs capables d'ajuster les fonctions locales et distantes de l'hôte, y compris l'homéostasie immunitaire et la physiologie de la barrière intestinale. Le microbiote intestinal influence également la voie IDO productrice de kynurénine, qui joue un rôle essentiel dans les mécanismes inflammatoires, les réponses immunitaires et les fonctions neurobiologiques. La production périphérique de sérotonine par les cellules d'entérochromaffines est aussi sous l'influence du microbiote intestinal. La sérotonine produite par l'intestin a de nombreux effets locaux, tels que la stimulation de la motilité intestinale, et même si elle ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, le microbiote intestinal affecte indirectement les voies sérotoninergiques centrales en modulant la disponibilité en tryptophane et tryptamine. Trp : tryptophane ; 5-HTP, 5-hydroxytryptophane ; IL, interleukine ; QA, acide quinolinique. D'après Cervenka et al., 2017.

4. La communication cellulaire et les cytokines

Les organismes du microbiote intestinal jouent divers rôles dans la promotion de la santé pour les environnements tissulaires locaux et extra-intestinaux. Ces propriétés bactériennes bénéfiques sont liées à la limitation de l'invasion des agents pathogènes, à la régulation du

métabolisme et à l'initiation des réponses immunitaires protectrices de l'hôte (Belkaid & Harrison, 2017). La lamina propria et les structures lymphoïdes associées à l'intestin situées le long du TGI abritent également le système immunitaire de la muqueuse intestinale, qui fournit une immunité protectrice contre une multitude de menaces microbiennes. Des études réalisées sur des souris *germ free*, dans divers contextes inflammatoires, ont révélé que le microbiote régule à la fois l'immunité innée et adaptative avec des conséquences fonctionnelles pour la défense de l'hôte contre les agents pathogènes et la tolérance immunitaire aux stimuli non pathogènes. Des résultats identiques ont été retrouvés sur des souris sans agent pathogène spécifique traitées avec des antibiotiques à large spectre (Deshmukh *et al.*, 2014; Khosravi et al., 2014). Également, ce modèle animal de souris traitées aux antibiotiques présente une altération du développement des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse, un nombre réduit de granulocytes circulants et sont très sensibles aux infections bactériennes systémiques, reflet d'une altération du système immunitaire (Deshmukh *et al.*, 2014; Khosravi *et al.*, 2014).

Les cellules lymphoïdes innées (CLI), homologues immunitaires innés des cellules auxiliaires T CD4 mais n'exprimant pas les récepteurs antigéniques, ont également leur développement et leur fonctionnement altérés chez les souris *germ free* (Britanova & Diefenbach, 2017). De plus, la production d'IL-22 par les CLI du groupe 3 (CLI3) est considérablement réduite en l'absence du microbiote intestinal, qui est essentiel pour l'immunité de l'hôte aux infections bactériennes entériques. En lien direct avec les CLI3, différents micro-organismes intestinaux du microbiote présents dans le TGI expriment à leur surface des motifs moléculaires associés aux micro-organismes (MAMPs). Ces motifs bactériens sont détectés par les récepteurs TLRs ainsi que les récepteurs *Nod-like* des macrophages et leur activation conduit à la synthèse de l' IL-1β (Thaiss *et al.*, 2016). À son tour, la libération d'IL-1β active les CLI3 pour produire le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages et l'IL-22, afin de maintenir l'homéostasie des lymphocytes T régulateurs et la tolérance orale aux antigènes alimentaires (Mortha *et al.*, 2014). Le microbiote intestinal joue également un rôle important dans la fonction adaptative des cellules immunitaires (Belkaid & Harrison, 2017). Plus particulièrement, les micro-organismes intestinaux régulent l'équilibre entre les cellules T helper 17 pro-inflammatoires et les lymphocytes T régulateurs anti-inflammatoires dans le TGI, et dont la balance est fonction de l'homéostasie immunitaire capable de prévenir l'inflammation pathologique intestinale et systémique. De plus, les micro-organismes intestinaux sont impliqués dans l'activation des cellules B dépendantes et indépendantes des cellules T et dans la libération subséquente d'immunoglobulines intestinales et systémiques qui limitent les réponses inflammatoires envers les micro-organismes intestinaux eux-mêmes (Belkaid &

Harrison, 2017; Britanova & Diefenbach, 2017). L'ensemble de ces faits bibliographiques démontrent que les micro-organismes intestinaux prennent part à la régulation de l'immunité dans son ensemble en régulant les fonctions des cellules immunitaires. Cet état de fait explique ainsi les perturbations immunitaires retrouvées dans la grande majorité des études précliniques utilisant le modèle murin *germ free*.

Outre une interaction avec les cellules immunitaires, le microbiote peut interagir directement avec les acteurs moléculaires du processus de défense de l'organisme. Parmi ces différentes cibles, on retrouve en premier lieu l'inflammasome, une classe de récepteurs immunitaires innés cytosoliques qui reconnaît les MAMPs et les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs). Récemment, les voies de signalisation intracellulaires faisant intervenir ces acteurs moléculaires, et notamment celle de l'inflammasome NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) sont devenues des voies critiques impliquées dans la régulation des interactions microbiote-immunité (Man, 2018). Son activation entraîne un clivage médié par les caspases 1 ou 11 et qui a pour finalité la maturation et la libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18 (Yang *et al.,* 2019). Classiquement connus pour répondre aux agents pathogènes bactériens intracellulaires tels que *Shigella*, *Salmonella* et *Legionella*, des études récentes suggèrent que les inflammasomes jouent un rôle important dans la coordination des interactions entre le microbiote intestinal sain et le système immunitaire de l'hôte (Levy *et al.,* 2015; Man 2018) (*Figure 12, p.70*). Ainsi, la perte des inflammasomes NLRP3 et NLRP6 est associée à une altération de la composition du microbiote et à une susceptibilité accrue de colite (Henao-Mejia *et al.,* 2012; Wlodarska *et al.,* 2014), une condition souvent liée à l'inflammation systémique observée dans les troubles neuropsychiatriques.

Au niveau cérébral, une activation accrue des cellules microgliales entrainent une neuroinflammation. Chez l'homme, cet état d'inflammation chronique du cerveau conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et l'expression des marqueurs antigéniques par les cellules gliales capables de contrôler l'activité des neuromédiateurs (Wang *et al.,* 2018). Une fois de plus, ces données ont été confirmées par des études précliniques menées sur des animaux *germ free* (ou traités avec des antibiotiques) qui présentent une altération de la maturation, de l'activation et de la différenciation des cellules microgliales. Ces modifications fonctionnelles entrainent des changements morphologiques des cellules microgliales résultant à terme, à un dérèglement des réponses immunitaires (Erny *et al.,* 2015). Ceci illustre le fait que la diversité du microbiote intestinal est nécessaire pour le maintien, la santé, la maturation et le bon fonctionnement de la microglie et par conséquent le fonctionnement normal du SNC (Erny *et al.,* 2015).

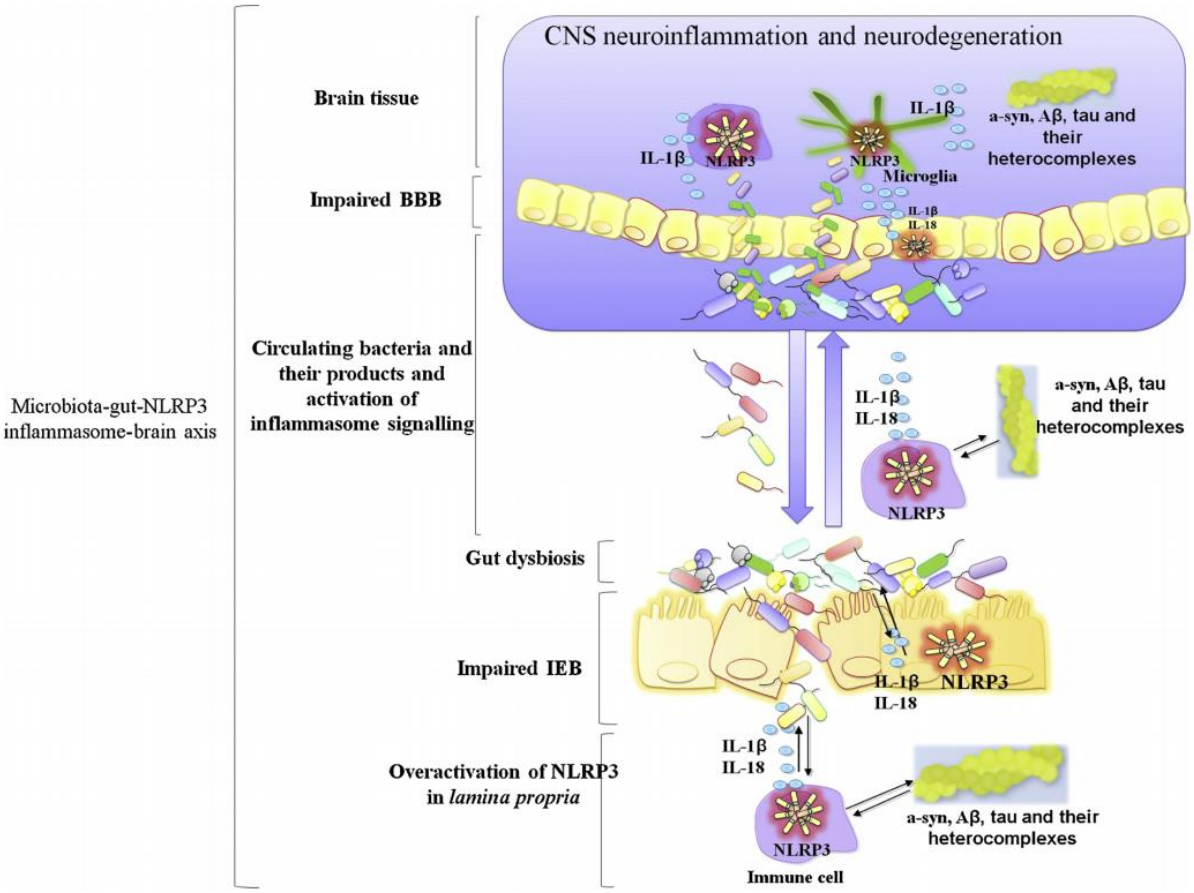


Figure 12 : Inflammasome et axe intestin-cerveau.

Les bactéries entériques peuvent favoriser l'activation de NLRP3 qui, à son tour, façonne les réponses neurogènes/inflammatoires périphériques et centrales, contribuant ainsi à l'apparition de la neuroinflammation et de la neurodégénérescence du SNC. Aβ, bêta-amyloïde ; α-syn : a-synucléine ; Aβ : bêta-amyloïde ; CNS : système nerveux central ; IEB, barrière épithéliale intestinale ; NLRP3 : nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain-containing protein 3. D'après Pellegrini et al., 2020.

Le microbiote peut également impacter les processus neuroinflammatoires en agissant sur la migration des monocytes de la périphérie vers le SNC (D'Mello *et al.*, 2009; Hyland & Cryan, 2016). Ce phénomène de migration cellulaire peut être étudié au travers d'un modèle murin d'inflammation du foie. En effet, les patients atteints de maladies inflammatoires impliquant des organes périphériques subissent généralement une altération de la fonction cérébrale conduisant à des symptômes qui nuisent à leur qualité de vie. L'équipe de D'Mello a décrit une nouvelle voie de signalisation périphérique survenant dans le cadre d'une inflammation du foie, qui implique une augmentation de la production périphérique de TNF-α. Cette hausse du TNF- α entraîne une augmentation de l'activation microgliale, suivie du recrutement des monocytes dans le cerveau, le système vasculaire et le parenchyme cérébral,

qui à leur tour entraînent le développement de comportements tels que la fatigue, les troubles de l'humeur ou encore le dysfonctionnement cognitif (D'Mello *et al.*, 2013). Ils ont ainsi montré que l'administration d'un traitement à base de probiotiques composé de quatre souches de *Lactobacillus*, trois de *Bifidobacteriaceae* et une de *Streptococcus* réduit la migration des monocytes induit par le TNF-α au sein de leur modèle animal d'inflammation périphérique présentant les troubles comportementaux énoncés précédemment (D'Mello *et al.*, 2015).

Enfin, les souris transgéniques *knock-out* pour le gène Rag1 (*Recombination activating gene 1*), impliqué dans le développement du système immunitaire adaptatif, permet la mise en place d'un modèle murin dépourvu de lymphocyte. Cette délétion génétique entraine chez l'animal des modifications de la cognition et du comportement (principalement l'anxiété), un phénotype amélioré grâce à une administration de probiotiques (*L. rhamnosus* et *L. helveticus*) (Smith *et al.*, 2014). Par conséquent, un traitement à base de bactéries probiotiques peut potentiellement atténuer les effets négatifs du microbiote intestinal, sur l'immunité adaptative et les modifications comportementales, causés principalement par une dysbiose intestinale ou en condition pathologique, ce qui souligne l'importance du système immunitaire dans l'axe microbiote-intestin-cerveau.

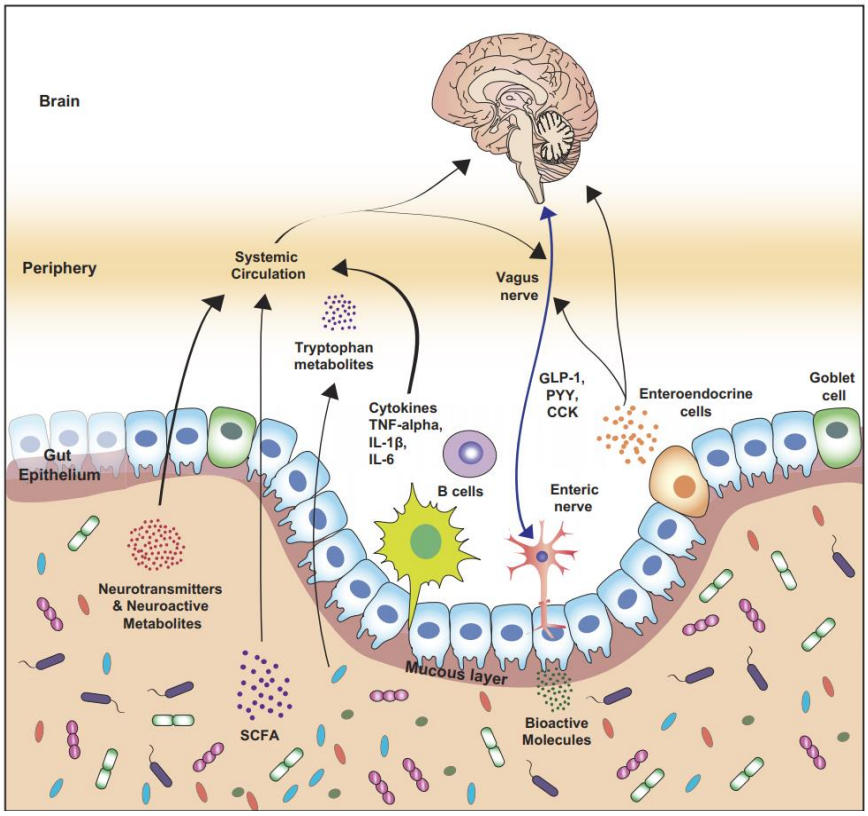


Figure 13 : Schéma des voies de communication bidirectionnelles connues entre le microbiote intestinal et le cerveau.

CCK, cholécystokinine; GLP-1, peptide-1 de type glucagon; IL, interleukine; PYY, peptide YY; TNF, facteur de nécrose tumorale; SCFA, acide gras à courte chaîne. D'après Cryan et al., 2019.

5. Impact des modifications du microbiote intestinal sur les mécanismes de la maladie d'Alzheimer : hypothèses

a. Alteration du microbiote intestinal et retentissement dans la MA

Plusieurs études précliniques sur les souris transgéniques APP/PS1, un modèle murin d'étude de la MA, ont apporté des preuves fortes du lien entre microbiote intestinal et le processus physiopathologique de la MA. Tout d'abord, l'utilisation d'antibiotiques à large spectre et à doses élevées chez ces souris transgéniques conduit à la potentialisation de la neuroinflammation (associée à une augmentation de cytokines pro-inflammatoires et chémokines) et du processus physiopathologique de la MA (Minter *et al.*, 2016). Ensuite, la caractérisation de ce modèle a révélé que le microbiote de ces souris, en l'absence de traitement, diverge dans sa composition de celui des souris non transgéniques. Pour aller plus loin, la génération de souris APP/PS1 *germ free* a permis d'observer chez ces animaux une réduction de la production de peptides Aβ (Aβ38, Aβ40 et Aβ42) par rapport aux souris APP/PS1 ayant conservé leur microbiote originel. De plus la transplantation de microbiote fécal (TMF) de souris APP/PS1 chez ces souris APP/PS1 *germ free* restaure la production pathologique de peptides Aβ, ce qui indique que la dysbiose intestinale présente dans ce modèle murin de MA est un facteur critique pour l'évolution de la pathologie (Harach *et al.*, 2017). L'utilisation du modèle animal SAMP8 (*Senescence accelerated mouse prone 8*), un modèle spontané de vieillissement précoce induit par une surproduction d'APP, conforte les différents résultats de la littérature retrouvés sur le modèle APP/PS1 (Cui *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2018). Des travaux réalisés sur ce modèle animal ont préalablement démontré qu'un protocole de stress chronique, basé sur une exposition aux bruits, favorise le phénotype Alzheimer déjà présent chez ces souris et diminue la diversité bactérienne du microbiote (Su *et al.*, 2018). En continuité de ces résultats, la TMF d'une souris SAMP8 ayant subi un protocole d'exposition chronique aux bruits a été réalisée sur des souris SAMP8 contrôles. Les effets de cette TMF démontrent une augmentation des niveaux de peptides Aβ hippocampiques et une diminution des protéines de jonction serrée claudine-1 et ZO-1 dans l'intestin et le cerveau des animaux (Cui *et al.*, 2018). Ces résultats précliniques réalisés sur le modèle murin SAMP8 soutiennent donc une hypothèse causale du microbiome intestinal dans la MA. Par ailleurs, des souris C57BL/6N *germ free* transplantées avec des microbiotes fécaux issus de patients Alzheimer ont présenté une diminution de leurs performances cognitives comparativement aux souris contrôles, transplantées avec le microbiote de sujets humains non atteints (Fujii *et al.*, 2019). Pour finir,

et dans une logique inverse, la TMF de souris contrôles chez des souris APPswe/PS1dE9, utilisées en tant que modèle d'étude de la MA, améliore les déficits cognitifs, réduit les dépôts cérébraux de peptides Aβ (Aβ40 et Aβ42) et les niveaux de tau phosphorylés chez ces animaux (Sun *et al.,* 2019). Les souris transplantées ont aussi présenté une augmentation de l'expression postsynaptique de PSD-95 (*postsynaptic density protein-95*) et de la synapsine I ainsi qu'une diminution des niveaux de marqueurs inflammatoires, dont l'expression de la COX-2 et du marqueur microglial CD11b (Sun *et al.,* 2019). Outre une modification de la diversité et de la composition du microbiote, la TMF induit également une augmentation des niveaux d'AGCCs chez les souris transplantées (Sun *et al.,* 2019).

L'implication du microbiote dans l'étiologie de la MA a également été mise en lumière par des études cliniques chez l'homme. Cependant, la majorité des travaux ont été réalisés post-mortem, compliquant l'étude de relation de cause à effets entre le microbiote intestinal et la pathologie de la MA (Zhan *et al.,* 2016; Zhao *et al.,* 2017a & 2017b). Outre la limitation de la cinétique d'apparition des altérations microbiote-intestin-cerveau, les bactéries anaérobies se développent de manière non aléatoire lors du décès du patient, en partant du tractus gastro-intestinal et en colonisant par la suite les autres organes pouvant potentiellement biaiser les analyses du microbiote en lien avec la MA. Malgré les limitations de ces études, des analyses réalisées par l'équipe de Zhan ont montré des niveaux plus importants de LPS et de *E. coli K99* dans le cerveau de patients Alzheimer comparé à des patients contrôles, mettant en relation la présence d'agents bactériens Gram-négatif avec la neuropathologie de la MA (Zhan *et al.,* 2016). Les rares études menées chez les patients MA en vie révèlent que la dysbiose intestinale et les interactions microbiote-hôte jouent un rôle dans la neurodégénération (pour revue, voir Kesika *et al.,* 2021). À ce jour, peu d'études à notre connaissance sont retrouvées dans la littérature sur la TMF de patients sains à des patients atteints de la MA. Cependant, un rapport de cas existe relatant l'amélioration des capacités cognitives d'un patients de 82 ans ayant suivi cette procédure en raison d'une infection à *Clostridioides difficile.* Ce patient, présentant un MCI avec un score de MMSE de 20 en amont de la TMF a présenté une amélioration du score MMSE (à 26) deux mois après la procédure. Ce patient avait été transplanté avec le microbiote fécal de sa femme de 85 ans, saine de tout diagnostic de démence (Hazan, 2020).

b. Inflammation systémique/neuroinflammation

Des données épidémiologiques ont établi un lien entre les maladies inflammatoires de l'intestin et divers troubles neuropsychiatriques et neurodégénératifs (Villumsen *et al.,* 2019).

Dans les maladies inflammatoires de l'intestin, les micro-organismes intestinaux sont de puissants moteurs de la mise en place d'une inflammation intestinale en conditions pathologiques. Cela s'explique en partie par la dégradation des mécanismes physiques et immunitaires qui maintiennent la séparation entre les micro-organismes intestinaux et le système immunitaire de l'hôte (Ananthakrishnan *et al.,* 2018). Les processus inflammatoires intestinaux, renforcés en cas de dysbiose, provoquent la migration des cellules polymorphonucléaires de la circulation sanguine vers la muqueuse intestinale, pouvant aller jusqu'à la lumière intestinale, en cas de perturbation de l'architecture de la muqueuse. En clinique, le processus d'inflammation intestinale peut être mesuré indirectement en évaluant la concentration de calprotectine ou de lipocaline-2 (Lcn-2) dans les selles, deux biomarqueurs capables de discriminer des lésions de la muqueuse digestive avec une bonne sensibilité et spécificité. La calprotectine, en particulier, est une petite protéine de liaison au calcium (plus précisément un hétérodimère de S100A8/A9) et qui contribue à 60 % de la teneur en protéines du cytosol des neutrophiles, lui conférant de ce fait des propriétés antimicrobiennes (Walsham & Sherwood, 2016). Les protéines S100A8 et S100A9 ont des séquences d'acides aminés intrinsèquement amyloïdogènes et peuvent former des oligomères et des fibrilles amyloïdes. Ces deux conformations spatiales ressemblent étroitement aux polypeptides amyloïdes tels que le peptide Aβ et l'α-synucléine, et des études *in vitro* ont montré que la protéine S100A9 (organisée en monomère ou en dimère) peut induire une fibrillation de peptides Aβ (Wang *et al.,* 2014). La protéine S100A9 est sécrétée par les macrophages et la microglie pendant la formation de la plaque amyloïde et induit également son expression dans les cellules neuronales pouvant activer davantage la microglie via le TLR4 et le RAGE (Wang *et al.,* 2014).

Les niveaux de calprotectine sont significativement augmentés dans le LCS et le cerveau des patients atteints de MA, ce qui favorise son agrégation amyloïde et sa co-agrégation avec les peptides Aβ (Wang *et al.,* 2014). Un niveau élevé de calprotectine fécale a été trouvé dans près de 70 % des patients MA, ce qui la désigne comme un biomarqueur potentiel de la maladie (Leblhuber *et al.,* 2015). Il est possible que la calprotectine puisse circuler dans la circulation sanguine et contribuer à la neuroinflammation ainsi qu'à la formation des plaques amyloïdes dans l'intestin ou directement dans le cerveau. L'inflammation intestinale et la dysbiose sont directement associées au dysfonctionnement de la barrière intestinale et une perméabilité intestinale accrue contribuant indirectement au processus de neurodégénérescence (Sochocka *et al.,* 2019).

La barrière intestinale est composée de la couche de mucus, de l'épithélium intestinal et de la lamina propria comme représenté en *figure 14* (*p.76*). L'interruption physique de cette

barrière entraîne une augmentation de la perméabilité provoquant la translocation de bactéries et de substances nocives dans la circulation sanguine (Potgieter *et al.,* 2015). Un très grand nombre de bactéries localisées dans le côlon est physiquement séparé de l'hôte par une couche de mucus épais, impénétrable et indispensable pour la symbiose entre le microbiote et son hôte. En revanche, au niveau de l'intestin grêle, la composition spécifique du mucus permet le passage des particules à haut poids moléculaire. Cependant, des concentrations élevées d'agents antibactériens (tels que Reg3-γ pour *Regenerating Family Member 3γ*) contrebalancent cette perméabilité induite par le mucus et empêchent les bactéries d'atteindre la surface cellulaire. La composition du microbiote détermine directement les propriétés de la couche de mucus par sa promiscuité physique, ce qui influence sa perméabilité (Jakobsson *et al.,* 2015). Par exemple, l'abondance de bactéries *Akkermansia muciniphila* dégrade la mucine, une glycoprotéine permettant la conception du mucus de l'intestin grêle, ce qui a pour effet de détériorer la fonction de barrière intestinale, et de favoriser l'obésité et l'inflammation systémique (Alkasir *et al.,* 2017).

Également, certaines souches probiotiques ont la capacité d'agir sur les jonctions serrées de la barrière intestinale, comme *Lactobacillus plantarum, E. coli Nissle* et *Bifidobacterium infantis* qui renforcent la barrière intestinale en augmentant l'expression des protéines formant des jonctions serrées (claudines, occludine et ZO) (Bischoff *et al.,* 2014), ou à l'inverse, altèrent la barrière comme pour les souches pathogènes d'*E. coli, Salmonella, Shigella, Helicobacter pylori, Vibrio* ou *Clostridium* (König *et al.,* 2016). D'autres produits bactériens, les exotoxines, peuvent perturber l'intégrité des cellules épithéliales. C'est le cas par exemple de l'exotoxine sécrétée par *Bacteroides fragilis* qui perturbe les jonctions d'adhérence en clivant la molécule d'adhésion cellulaire, l'E-cadhérine (Choi *et al.,* 2016). Une altération de la structure des jonctions serrées et une augmentation de la perméabilité intestinale sont liées à une dysbiose intestinale et ont été trouvées dans un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique, un autre trouble neurodégénératif lié au dépôt d'amyloïde (Wu *et al.,* 2015).

Des altérations des taxons microbiens intestinaux aux propriétés pro-inflammatoires et anti-inflammatoires ont été observées dans la MA. Le microbiote intestinal des patients de la MA est enrichi en *E. coli* et *Shigella* (Cattaneo *et al.,* 2017), qui sont de puissants acteurs pro-inflammatoires d'une l'inflammation intestinale aiguë (Sansonetti 2001). L'abondance d'*E. coli* et de *Shigella* a été corrélée avec l'expression des gènes inflammatoires IL-1β, NLRP3 et de la chémokine CXCL2 (*Chemokine (C-X-C motif) ligand 2*) au niveau de la circulation sanguine. À l'inverse, une réduction de la concentration bactérienne de *Clostridium* dans le microbiote

intestinal des patients Alzheimer est corrélée positivement à une élévation du rapport Aβ42/Aβ40 dans le LCS (Vogt *et al.*, 2017).

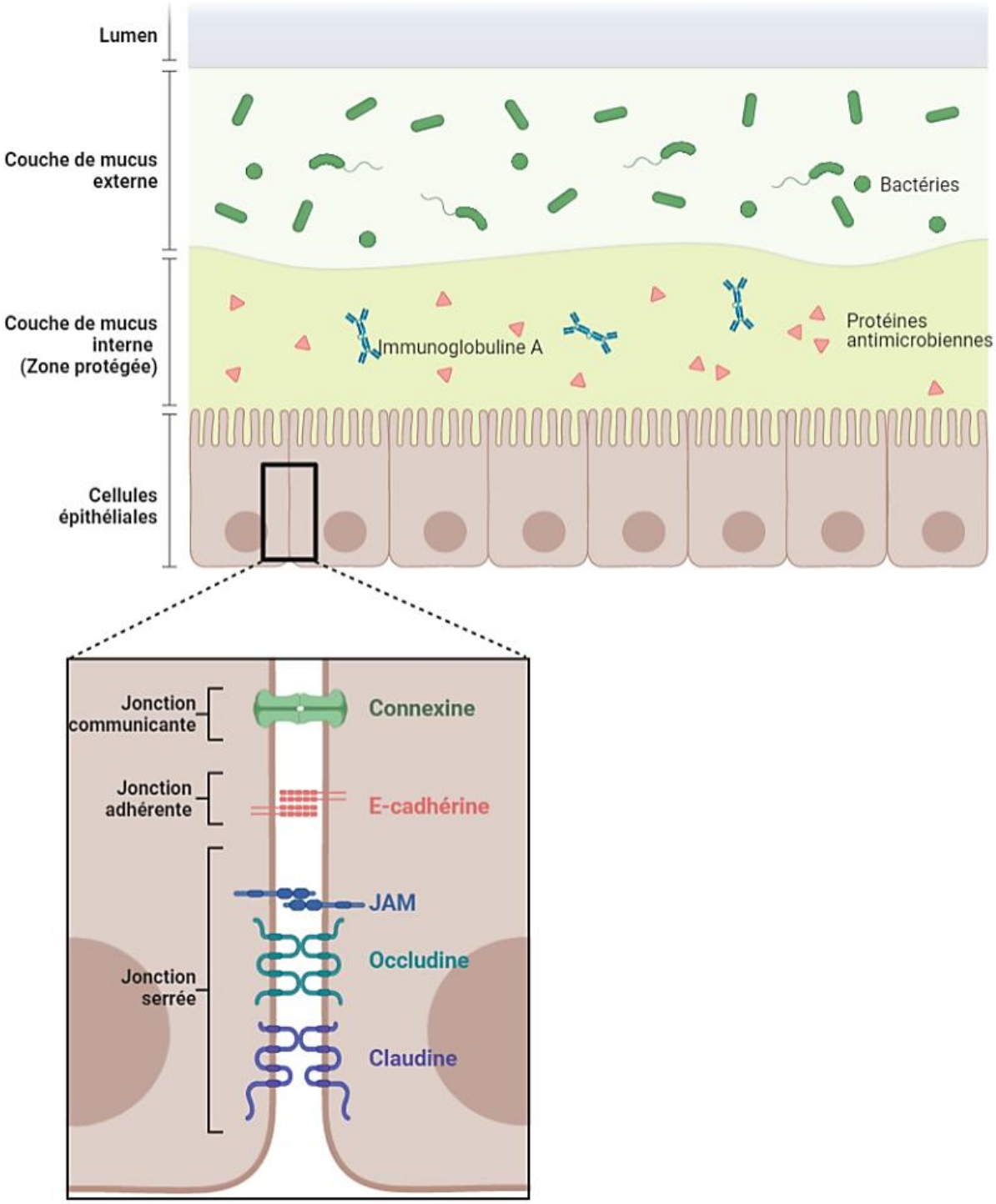


Figure 14 : Schéma de la barrière intestinale saine.

JAM, junctional adhesion molécule. Figure réalisée avec BioRender.

Bien que le lien entre le système immunitaire et le microbiote intestinal ne soit que très peu exploré par la littérature, plusieurs pistes suggèrent que la communication existante entre l'intestin et le cerveau puisse aboutir à la mise en place de mécanismes neuroinflammatoires. Dans cette continuité, certaines espèces bactériennes du microbiote intestinal libèrent naturellement de grandes quantités de LPS, de peptides Aβ et d'autres molécules pro-inflammatoires. En cas de libération continue par le microbiote, ces différents messagers de l'inflammation vont sortir du TGI pour s'accumuler dans le compartiment systémique et pourront rejoindre le tissu cérébral. Cette accumulation de molécules en périphérie peut potentiellement contribuer aux modifications de l'inflammation liées à l'âge et à la neurodégénérescence observée dans la MA (Zhao & Lukiw, 2015). En s'intéressant à l'hypothèse d'un lien entre le LPS et la MA, une étude portée sur un modèle murin a montré que des injections intrapéritonéales répétées de LPS favorisait l'accumulation hippocampique de peptides Aβ42 et réduisait par conséquent la fonction cognitive (Kahn *et al.,* 2012). Dans une étude *in vivo*, l'exposition de cellules cérébrales humaines au LPS (de *B. fragilis*) a mis en évidence une augmentation de l'expression de la voie NF-κB résultant en une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires et conduisant à une neurodégénérescence des cellules cérébrales (Lukiw, 2016). Un défaut dans la perméabilité intestinale permet notamment au LPS par exemple d'entrer dans la circulation sanguine, entrainant des niveaux anormaux de cytokines pro-inflammatoires dans le plasma telles que l'IL-6, IL-10 ou encore le TNF-α (Pistollato *et al.,* 2016).

c. Système nerveux entérique

Le SNE, impliqué dans certains troubles gastro-intestinaux, possède également un rôle dans la physiopathologie de la MA ou encore du trouble du spectre autistique (Rao & Gershon, 2016). L'APP est exprimée de façon constitutive par les neurones entériques et la glie, ce qui conforte l'hypothèse d'une implication du SNE dans la physiopathologie de la MA (Arai *et al.,* 1991). Les études de suivi de patients MA axées sur l'étude du SNE sont rares et ont montré des résultats contradictoires, en partie dus à la différence de protocole entre les études. Au moyen d'une approche préclinique, Puig et ses collaborateurs ont montré dans le modèle transgénique APP/PS1 de MA une accumulation de peptides Aβ dans les neurones entériques, ce qui aboutissait à une diminution du nombre de neurones, une dysmotilité et un risque accru d'inflammation intestinale (Puig *et al.,* 2015). Cependant ces résultats précliniques n'ont pas été confirmés par les travaux de Han et ses collaborateurs (Han *et al.,* 2017). Néanmoins, la

densité des macrophages intestinaux et les niveaux protéiques de facteurs pro-inflammatoires étaient augmentés de façon significative au sein de l'intestin, ce qui suggère que le dépôt entérique de peptides Aβ initie tout de même une réponse inflammatoire (Han *et al.,* 2017).

Une autre étude réalisée sur des échantillons d'autopsie de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle et du gros intestin de 18 patients MA a révélé qu'il n'y avait aucune différence dans la densité des neurones entériques ou encore de neurodégénérescence (via utilisation d'un anticorps dirigé contre un dérivé de la protéine tau) entre les patients atteints de MA et les témoins du même âge, ou encore entre les patients atteints de MA et ceux atteints de démence non MA (Shankle *et al.,* 1993). Puig et ses collaborateurs ont quant à eux rapporté une immuno-réactivité élevée des peptides Aβ dans le côlon de 11 patients MA, mais n'ont pas inclus de témoins rendant de ce fait discutable la véracité des résultats présentés (Puig *et al.,* 2015). Aux vues du manque de consensus, présent à la fois sur les données précliniques et cliniques, de nouvelles investigations sur la pathologie neuronale entérique dans la MA sont nécessaires afin de compléter les résultats parcellaires présents dans la littérature.

d. Acides gras à courte chaine

Le butyrate, dont les effets neuroprotecteurs ont été décrits précédemment, a été indiqué comme traitement valable pour les troubles neurologiques, tels que la maladie de Parkinson (Liu *et al.,* 2017). Concernant la MA, Govindarajan et ses collaborateurs ont montré que le butyrate améliorait la cognition dans un modèle de MA chez les rongeurs (Govindarajan *et al.,* 2011).

Concernant le propionate, l'analyse de la salive de personnes atteintes de démences montrent des niveaux de propionate 1,35 fois plus importants en comparaison avec les sujets sains (Figueira *et al.,* 2016). Le propionate est un membre important des AGCCs produit principalement par les *Bacteroidetes* présents dans l'intestin humain (Aguirre *et al.,* 2016; Salonen *et al.,* 2014) grâce à une conversion des sucres d'hexose en propionate par la voie du succinate (Reichardt *et al.,* 2014). La concentration de *Bacteroidetes* au sein de l'organisme varie au cours de la vie d'une personne, sa concentration étant corrélée positivement avec l'âge (Claesson *et al.,* 2011; Odamaki *et al.,* 2016). Les *Bacteroidetes* semblent donc jouer un rôle dans la MA et leur concentration augmente naturellement au cours du vieillissement, ce qui pourrait expliquer en partie les niveaux excessifs de propionate retrouvés dans la MA. Des études ont également constaté que le phylum *Bacteroidetes* était augmenté chez les personnes atteintes de la MA par rapport aux témoins sains, suggérant une augmentation de cette

concentration bactérienne en lien directe avec la pathologie (Haran *et al.*, 2019; Vogt *et al.*, 2017). Vogt et ses collaborateurs ont également montré que les niveaux de plusieurs marqueurs de la MA dans le LCS étaient corrélés positivement avec l'abondance relative du genre *Bacteroides* (Vogt *et al.*, 2017). Pour finir, les données précliniques de la littérature ont conclu à une augmentation du phylum *Bacteroidetes* au sein de différents modèles murins d'étude de la MA (Harach *et al.*, 2017; Kaur *et al.*, 2020).

e. Autres

Il a également été émis l'hypothèse que l'amyloïde fonctionnel (ayant une fonction servant la physiologie de la cellule) libéré du microbiote intestinal provoque le mauvais repliement des protéines neuronales et conduit à une activation de l'immunité innée et une subséquente neuroinflammation (Friedland, 2015). D'après cette hypothèse, les peptides Aβ produits se propageraient comme le fait un prion. Autrement dit, lorsque les prions sont administrés oralement, ils s'accumulent dans les cellules dendritiques folliculaires des plaques de Peyer (un des constituants du tissu lymphoïde de l'intestin) pour ensuite se déplacer vers le SNE. Grâce à leur interaction avec les cellules dendritiques folliculaires ils se propagent jusqu'au cerveau (Friedland, 2015). Par la même occasion, il a été rapporté chez les souris à sénescence accélérée la présence de peptides Aβ dans les plaques de Peyer comparé à des souris témoins (Yoshioka *et al.*, 1990). Enfin, deux études réalisées par Galloway et ses collaborateurs ont mis en évidence une accumulation de peptides Aβ dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle dans des modèles alimentaires hyperlipidiques chez la souris (Galloway *et al.*, 2007 & 2009).

Outre les métabolites, les micro-organismes eux-mêmes peuvent migrer dans la circulation systémique et atteindre le cerveau en profitant d'une altération de la BHE. Lors de dysbiose intestinale, des micro-organismes pathogènes peuvent prendre le dessus sur le microbiote résident de l'hôte et traverser les barrières altérées, comme la barrière intestinale afin d'atteindre le compartiment intravasculaire et finalement le cerveau après le passage au travers de la BHE (Logsdon *et al.*, 2018). Par conséquent, une dysbiose intestinale peut concourir à une augmentation de la perméabilité des barrières intestinale et hémato-encéphalique, conduisant de ce fait à une colonisation ultérieure du cerveau et à une neuroinflammation favorable à la pathogénèse de la MA (Dando *et al.*, 2014).

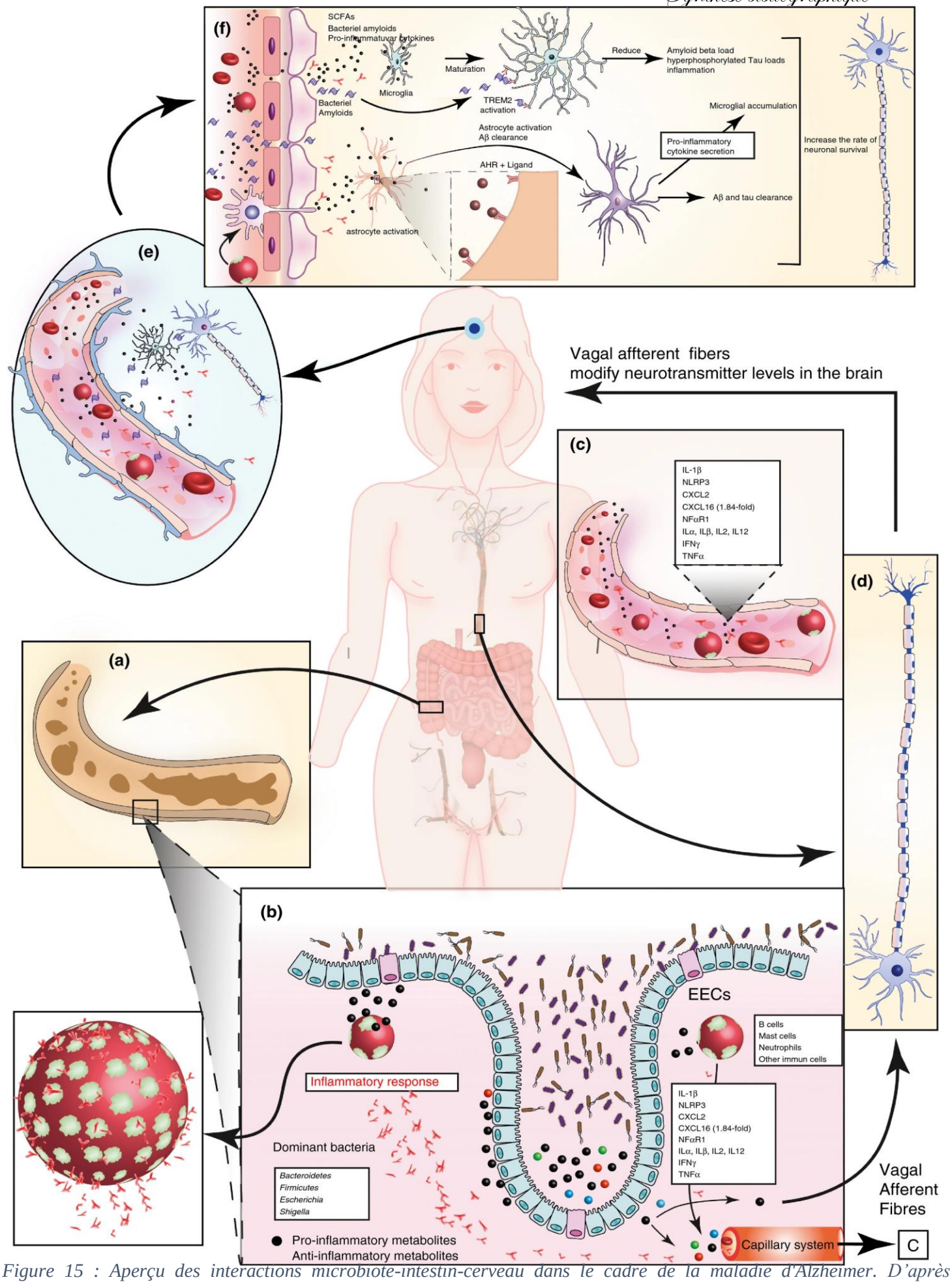


Figure 15 : Aperçu des interactions microbiote-intestin-cerveau dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. D'après Bostanciklioğlu, 2019. SCFAs, acides gras à courte chaîne ; TREM 2, triggering receptor expressed on myeloid cells 2.

6. Maladie d'Alzheimer et probiotiques

Les probiotiques ont été définis par la FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations) et l'OMS comme étant « des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates produisent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (Suez *et al.*, 2019). Les deux principaux genres bactériens ayant montré leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte sont *Lactobacillus sp*. et *Bifidobacteria sp*. (Gareau *et al.*, 2011; Savignac *et al.*, 2015). Peu d'études à notre connaissance ont porté sur l'interaction probiotiques-aliments et plus précisément sur les lipides. En revanche, plusieurs articles mentionnent des conséquences bénéfiques de l'utilisation de probiotiques sur le statut inflammatoire, oxydant, les capacités mnésiques et la neurogenèse dans la MA.

a. Essais sur les modèles animaux de MA

Dans le modèle de souris AD 3xTg (APPSwe, tauP301L), l'administration d'un mélange de probiotiques, le SLAB51 (composé de *S. thermophilus, B. longum, B. breve, B. infantis, L. acidophilus, L. plantarum, L. paracasei, L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* et *L. brevis*), diminue la production de peptides Aβ et les taux de marqueurs inflammatoires plasmatiques (IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-12, IFN-ɣ, et TNF-α) et d'hormones intestinales, influence le microbiote (augmente les *Bifidobacterium spp.* et réduit les *Campylobacterales*), la protéolyse neuronale et diminue les marqueurs de stress oxydant dans le cerveau (Bonfili *et al.*, 2017). Une administration de SLAB51 a également permis de réduire les acides acétiques, propioniques et butyriques dans les selles des animaux et d'améliorer les niveaux d'hormones peptidiques intestinales telles que la ghréline, la leptine ou encore le GLP-1 (Bonfili *et al.*, 2017 & 2021). Cette étude a apporté des preuves additionnelles que la modulation du microbiote induit des effets positifs sur la signalisation neuronale qui peuvent ralentir la progression de la MA (Bonfili *et al.*, 2017).

L'administration à long terme de *L. paracasei K71* chez des souris femelles SAMP8 améliore considérablement les performances cognitives dans le labyrinthe de Barnes et augmente les taux d'expression protéique du BDNF dans les hippocampes (Corpuz *et al.*, 2018). Dans un modèle de la MA induit de manière transgénique chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Néri & Ségalat, 2003), une colonisation intestinale par le probiotique *B. subtilis* a permis d'atténuer les changements comportementaux et neuronaux induits par le modèle (Cogliati *et al.*, 2020). D'autres études réalisées chez le rat ayant reçu une injection

intracérébrale de peptides $A\beta_{1-42}$ ont montré une amélioration de la mémoire à court terme, une augmentation des niveaux de BDNF dans les hippocampes (Shamsipour *et al.*, 2021), une augmentation d'acétylcholine et une diminution de la mort cellulaire dans le cerveau (Shamsipour *et al.*, 2021) après 8 semaines d'administration de probiotiques (*L. plantarum* et *Bifidobacterium bifidum*) couplée à des sessions d'exercices.

La souche *L. plantarum C29* améliore les troubles de la mémoire induits par le D-galactose chez les souris C57BL/6J. En effet, l'administration orale de *L. plantarum C29* a normalisé l'expression de la doublecortine (un marqueur de neurogenèse), du BDNF, du TNF-α et de l'IL-10 hippocampique chez les souris traitées au D-galactose (Woo *et al.*, 2014). De plus, l'administration de *L. plantarum C29* a supprimé de manière significative l'expression des marqueurs inflammatoires tels que iNOS et COX-2 et des marqueurs de sénescence (p16) chez les souris traitées au D-galactose (Woo *et al.*, 2014). De même, l'administration de *L. plantarum MTCC1325* pendant soixante jours a amélioré les symptômes liés à la MA chez les rats albinos traités au D-galactose (Nimgampalle & Kuna, 2017), ce qui atteste de la capacité de cette espèce bactérienne à réduire la survenue des symptômes liés à la MA. D'autres études ont mis en évidence les capacités des probiotiques à contrer les effets du D-galactose. En effet, Ho et ses collaborateurs ont montré qu'une administration d'un mélange de probiotiques (*L. paracasei ssp., L.paracasei BCRC 12188, L plantarum BCRC12251*, et *S. thermophilus BCRC13869*) a permis d'améliorer les performances au test de la piscine de Morris et de diminuer les niveaux de MDA systémique et central chez la souris (Ho *et al.*, 2019).

b. Essais chez l'homme

Parmi les études réalisées chez l'homme, un article de 2016 a mis en évidence les effets bénéfiques d'un mélange de probiotiques sur les performances cognitives des patients atteints de MA avec des altérations de l'état métabolique. En effet, cette étude de Akbari et ses collaborateurs de 12 semaines a montré une augmentation de l'ordre de 27% du score MMSE et une diminution de 45% de la protéine C réactive dans le sang des patients Alzheimer traités avec ce mélange de probiotiques (*Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Bifidobacterium bifidum*, et *Lactobacillus fermentum*). En revanche, aucune modification de la performance mnésique, du statut antioxydant et des niveaux de marqueurs inflammatoires n'a été rapporté (Akbari *et al.*, 2016). De nouvelles preuves ont été avancées lors d'un essai randomisé via IRM fonctionnel dans lequel l'effet bénéfique des probiotiques sur la neurocognition a été soutenu (Papalini *et al.*, 2019). En effet, dans cette étude le groupe

d'individu traité avec des probiotiques a montré une augmentation significative des performances de la mémoire de travail liée au stress.

Les études réalisées sur l'administration de probiotiques ne sont pour le moment que préliminaires et ne constituent en aucun cas un moyen de traitement de la MA mais plutôt un moyen de prévention à l'instar de l'alimentation. Une limitation de la supplémentation en probiotiques dans la MA concerne leurs colonisations transitoires et non prévisibles de la muqueuse intestinale. En effet, selon les individus, certains probiotiques peuvent s'implanter partiellement ou ne pas s'installer dans un microenvironnement intestinal déjà stable. Les humains ont un mécanisme de sélectivité pour les probiotiques dans lequel la résistance de la muqueuse intestinale aux probiotiques est spécifique à l'individu. Il est donc difficile de déterminer quel probiotique d'une supplémentation multi-probiotiques pourrait avoir un impact sur la physiopathologie de la MA (Zmora *et al.*, 2018). De plus, la surproduction de sérotonine par le microbiote intestinal peut parfois donner lieu à un syndrome sérotoninergique chez les sujets. Le syndrome sérotoninergique est souvent le résultat de médicaments inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine prescrits lors de dépression majeure qui entraine un excès de sérotonine dans le SNC et dans l'intestin (Feeney, 2007). Il reste donc encore beaucoup d'analyses complémentaires à réaliser afin de déterminer les meilleures compositions en probiotiques pour obtenir des propriétés les plus optimales suivant les individus et les fenêtres d'administration.

IV. Maladie d'Alzheimer et nutriments, la place de l'acide arachidonique

A. Alimentation, nutriments et prévention

1. Rôle des différents nutriments

De récents rapports de la littérature scientifiques ont suggéré qu'un certain nombre de composants alimentaires pourraient être utilisés comme stratégies de prévention de la MA. A ce titre, de nombreuses études ont exploré le rôle des composants alimentaires de manière individuelle comme les vitamines ou encore les polyphénols (Yang *et al.*, 2020). Les polyphénols, comme par exemple les flavonoïdes, ont la capacité de moduler le microbiote intestinal et particulièrement le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* (Yang *et al.*, 2020). Les flavonoïdes (anthocyanes et flavonols) que l'on retrouve dans les baies, sont les principaux

composés responsables des caractéristiques antioxydantes et anti-inflammatoires des aliments (Devore *et al.,* 2012; Kelly *et al.,* 2018). En effet, Devore et ses collaborateurs ont montré qu'une consommation élevée de baies et de flavonoïdes est corrélée positivement avec un déclin cognitif plus lent chez l'homme (Devore *et al.,* 2012).

En revanche, sur la base des résultats actuels, il est peu probable qu'un seul composant alimentaire puisse prévenir le développement de la MA ou ralentir sa progression. A partir de ce postulat, des études se sont intéressées aux habitudes de vie et aux régimes alimentaires dans le but de limiter le développement de la MA et sa progression clinique. En raison du rôle des facteurs de risque cardiovasculaires dans l'apparition et le développement de la MA (Santos *et al.,* 2017), les approches nutritionnelles ciblant l'insulino-résistance, la dyslipidémie et le stress oxydant ont permis de limiter les comorbidités, telles que le diabète, le syndrome métabolique et la dyslipidémie (Middleton & Yaffe, 2009; Schelke *et al.,* 2016). Conformément à la compréhension de l'interaction complexe entre la nutrition et la MA, une approche multi-nutriment a également été développée, basée sur la logique selon laquelle plusieurs molécules alimentaires pourraient interagir de manière synergique contre la MA, comme la choline et l'uridine. Un complément alimentaire a été conçu et breveté sous le nom de Souvenaid® contenant entre autres de la choline, de l'uridine et des AGs (Viñuela & Barro, 2021). Cependant, à ce jour, aucune preuve clinique formelle n'a été apportée en faveur d'un nutriment ou d'un mélange de composés alimentaires pour lutter efficacement contre la MA (Baptista *et al.,* 2020).

Cependant, la majorité des données en faveur de l'alimentation proviennent de démarches expérimentales pré-cliniques dont la transférabilité en clinique humaine reste complexe. Bien que ces études animales semblent prometteuses, peu de résultats ont donc été observés dans les essais sur l'homme en raison de l'avancement trop important de la maladie qui limite l'impact de la prévention alimentaire ou encore du manque de temps nécessaire pour réaliser des études longitudinales de cet ordre (Fischer *et al.,* 2018). De plus, l'hétérogénéité des protocoles et la rareté des études épidémiologiques et observationnelles cliniques à grande échelle sur le lien de causalité entre la nutrition et la MA rendent les résultats encore plus difficiles à interpréter.

Un grand groupe de nutriments étudiés pour leur intérêt préventif est les AGPIs, en particulier ceux de la série ω-3 et l'acide docosahexaénoïque (DHA) qui est le premier AGPI dans les neurones. Tandis que l'influence du DHA dans la MA ainsi que dans d'autres pathologies dégénératives a suscité l'intérêt de nombreuses recherches scientifiques et médicales (Quinn *et al.,* 2010). Il n'y a, en revanche que peu de travaux consacrés à l'étude de

l'acide arachidonique (ARA) comme facteur de susceptibilité, bien que celui-ci soit le deuxième AGPI et le principal représentant de la série ω-6 dans le cerveau (environ 20% des AGs neuronaux). L'autre caractéristique de l'ARA est qu'il peut être converti en de nombreux eicosanoïdes qui jouent un rôle important dans l'inflammation. Il est également impliqué dans les fonctions synaptiques en tant qu'AGnon estérifié. Des travaux antérieurs du laboratoire ont montré qu'un apport alimentaire en ARA sensibilise les souris à la neurotoxicité des oligomères de peptides Aβ et ce présent travail de thèse a pour ambition d'explorer les mécanismes qui peuvent être impliqués dans l'axe microbiote-intestin-cerveau. C'est pourquoi, nous présenterons ci-dessous l'état des connaissances sur la prévention alimentaire de la MA, la place de l'ARA dans les régimes alimentaires humains actuels et les effets physiopathologiques notamment dans la MA ainsi que son influence sur le microbiote intestinal.

2. *La prévention de la maladie d'Alzheimer, les différents régimes*

Les médicaments actuellement disponibles (inhibiteurs de la cholinestérase et antagoniste des récepteurs NMDA pour N-methyl D-aspartate) pour les patients de la MA ne sont capables de contrôler que partiellement les symptômes et ne ralentissent pas la progression de la MA. Il existe donc un besoin urgent d'investiguer de nouvelles approches thérapeutiques et préventives. Dans ce contexte, la modulation des habitudes alimentaires et des interventions nutritionnelles ciblées pourrait être un outil prometteur et peu coûteux. Différents types de régimes alimentaires existent, ayant montré de bons résultats sur le ralentissement du déclin cognitif que nous aborderons au sein de cette partie.

a. *Le régime Méditerranéen*

Le régime méditerranéen (MeDi) semble prometteur dans la prévention de la MA, y compris les stades précoces de la démence. Ce régime basé sur les habitudes alimentaires traditionnelles méditerranéennes est caractérisé par une consommation élevée de fruits et légumes, de légumineuses, de céréales, d'huile d'olive, de noix et de graines (source importante de graisses végétales insaturées), d'une consommation modérée de poisson et faible à modérée de produits laitiers et d'alcool (vin), mais aussi d'une consommation faible de viandes rouge et transformée (*Figure 16, p.86*). De plus en plus de preuves indiquent le potentiel neuroprotecteur du MeDi ainsi que sa capacité à réduire le risque de déclin cognitif, de MCI et de MA (Solfrizzi *et al.*, 2011; Solfrizzi & Panza, 2014).

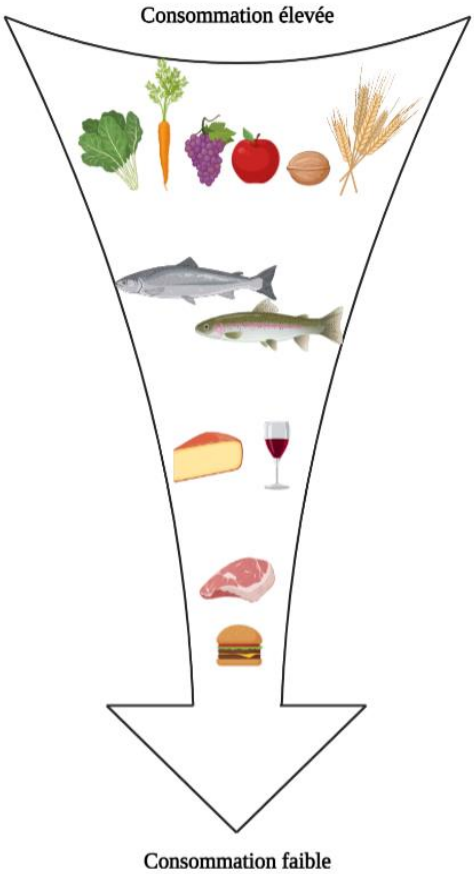


Figure 16 : Fréquence de consommation dans le régime Méditerranéen. Figure réalisée avec BioRender

Plusieurs études prospectives ont été publiées au cours des 15 dernières années examinant le rôle du MeDi dans la réduction du risque de démence et de MA. De nombreuses études américaines basées sur des cohortes multi-éthniques avec un suivi médian de 3 à 5,4 ans ont révélé qu'une plus grande consommation du MeDi est associée à une réduction du risque de MA (Gu *et al.*, 2010; Scarmeas *et al*., 2006), un risque plus faible de développer une MA chez les patients atteints de MCI (Scarmeas *et al.*, 2009), et une mortalité plus faible chez les patients atteints de MA, suggérant un rôle possible du MeDi dans la modulation non seulement des voies pathogéniques mais également de l'évolution ultérieure de la MA (Scarmeas *et al.*, 2007). Une étude longitudinale menée dans une population grecque dans le cadre de la *Hellenic Longitudinal Investigation of Aging and Diet* (HELIAD, Anastasiou *et al.*, 2017) a évalué l'adhésion au modèle MeDi en utilisant un score plus complexe, à savoir le *Mediterranean Dietary Score* (*MedDietScore*) (Panagiotakos *et al.*, 2007). Les auteurs de l'étude HELIAD ont constaté que chaque augmentation du *MedDietScore* est associée à une diminution de 10% du risque de démence.

Plusieurs revues et méta-analyses ont souligné l'association entre une adhésion au MeDi et une réduction du risque d'accident vasculaire cérébral, de dépression majeure et de maladies neurodégénératives (déclin cognitif, démence, MCI, MA et maladie de Parkinson), mais avec des résultats controversés (Aridi *et al.*, 2017; Petersson & Philippou, 2016; Singh *et al.*, 2014). Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces différences de résultats comme le recours à différentes méthodes d'évaluation des habitudes alimentaires généralement validées pour une population spécifique (habitudes alimentaires et une culture spécifique) et difficilement applicable à d'autres populations non méditerranéennes, comme les Américains ou les Australiens. De plus, il existe une grande hétérogénéité dans les caractéristiques des études, comme l'âge moyen des sujets, la durée du suivi et le nombre élevé de tests neuropsychologiques utilisés pour le diagnostic du MCI et / ou de la MA.

b. Le régime DASH

Le régime DASH, pour *Dietary Approaches to Stop Hypertension*, promu par le *National Heart, Lung, and Blood Institute* (NHLBI), est un régime alimentaire qui a d'abord été développé dans le but d'identifier les facteurs diététiques affectant la pression artérielle. Le régime DASH est un régime riche en fruits, légumes, noix, produits à base de céréales complètes, produits laitiers faibles en lipides, poisson et volaille, tous riches en nutriments qui font baisser la tension artérielle comme le potassium, le calcium, les « protéines maigres » et les minéraux et fibres. Le DASH limite également la consommation d'aliments comme les viandes rouges et transformées, les produits laitiers riches en matières grasses et les huiles riches en AGs saturés (palme par exemple), ainsi que les boissons sucrées et les sucreries. C'est donc un régime conçu pour être pauvre en sodium, en graisses saturées, en graisses totales et en cholestérol (Sacks *et al.*, 2001) (*Figure 17, p.88*).

Il a été démontré que ce type de régime alimentaire protège contre de nombreux facteurs de risque cardiovasculaires qui jouent un rôle dans le développement de la démence et de la MA (comme l'hypertension artérielle ou le mauvais cholestérol), au moins en partie en modulant les processus pathologiques qui caractérisent la physiopathologie de la MA (stress oxydant, inflammation et insulino-résistance) (Abbatecola *et al.*, 2018). DASH et MeDi partagent de nombreux composants alimentaires (c'est-à-dire les céréales complètes, les légumes et les noix), mais ils diffèrent dans la fréquence de consommation de produits laitiers faibles en matières grasses (apport modéré à élevé et faible consommation, respectivement).

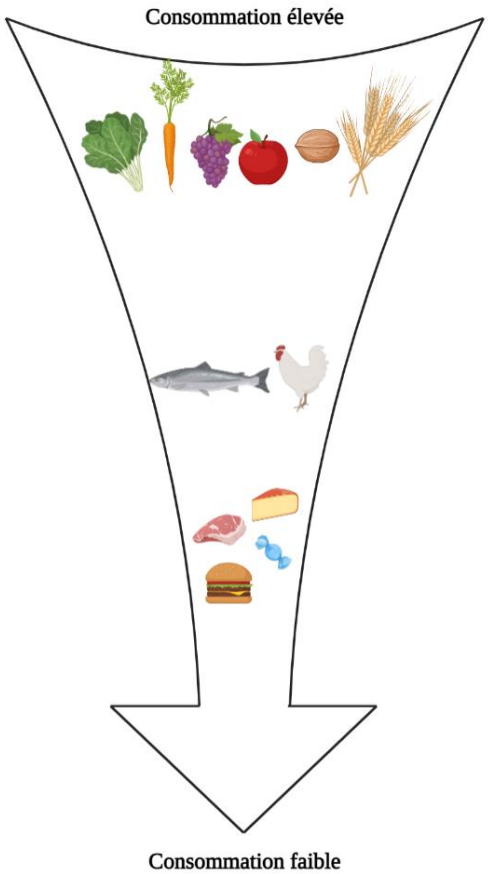


Figure 17 : Fréquence de consommation dans le régime DASH. Figure réalisée avec BioRender.

À ce jour, seules quelques études ont évalué les effets potentiels du régime DASH sur les fonctions cognitives ou sur la prévention de la MA et d'autres types de démence. Comme pour le MeDi, une plus grande adhésion au régime DASH a été associée à des ralentissement du déclin cognitif et à une incidence réduite de la MA (Berendsen *et al.*, 2017; Morris *et al.*, 2015). Dans l'étude de Morris et ses collègues (Morris *et al.*, 2015), seuls les individus présentant les scores DASH et MeDi les plus élevés étaient significativement associés à un taux plus faible de la MA (39% et 54% de réduction, respectivement). Berendsen et ses collaborateurs (Berendsen *et al.*, 2017) ont trouvé une association positive entre l'adhésion à long terme au régime DASH et une amélioration de la fonction cognitive chez les femmes américaines âgées participant à la *Nurses 'Health Study*.

c. *Le régime MIND*

Le régime MIND (*Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay*) a été développé il y a quelques années par des chercheurs du *Rush University Medical Center* de Chicago, et de la *Harvard School of Public Health* de Boston, en tant qu'hybride du régime

MeDi et DASH. Le MIND est basé sur 10 aliments sains pour le cerveau (légumes, noix, baies, haricots, grains entiers, poisson, volaille, huile d'olive et vin) qui ont tous une forte justification scientifique dans le domaine de la prévention nutritionnelle de la démence et limite 5 aliments « malsains » (viandes rouges, beurre et margarines, fromages, pâtisseries et confiseries, frites ou fast-food) (Koch & Jensen, 2016). Par rapport au MeDi, le régime MIND comprend une consommation plus faible de poisson, généralement une portion par semaine, tout comme le régime DASH ce qui met en avant les résultats d'études épidémiologiques, comme celle de Rotterdam (reprise par Kalmijn) qui a examiné le rôle de la consommation de poisson dans la prévention de la MA (Kalmijn *et al.*, 1997).

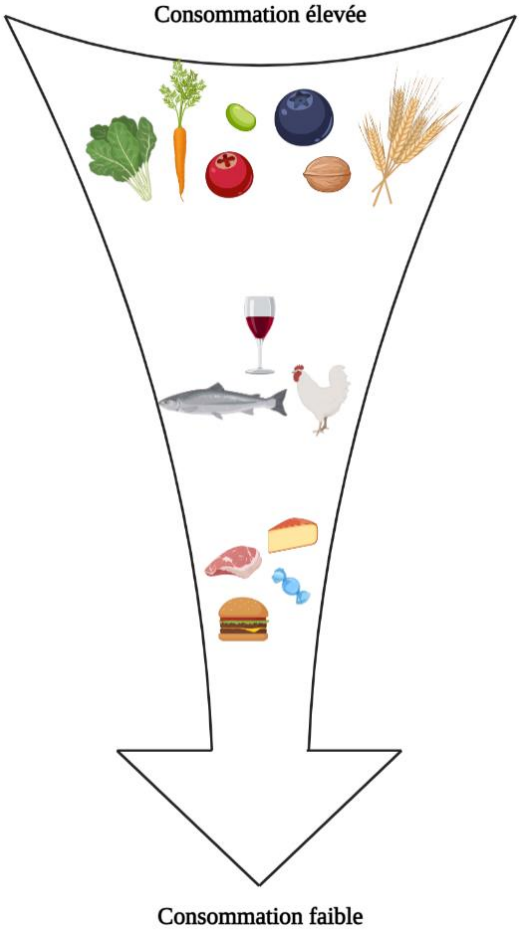


Figure 18 : Fréquence de consommation du régime MIND. Figure réalisée avec BioRender.

Comme indiqué ci-dessus, les légumes verts à feuilles, sont recommandés dans le MIND sur la base de plusieurs études épidémiologiques qui ont rapporté un lien notoire entre une consommation élevée et un déclin cognitif plus lent (Kang *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2006). Les baies représentent une catégorie distincte dans le régime MIND, reflétant de fortes associations entre la consommation de ce type de fruits et la santé du cerveau annoncées

précédemment. Les effets bénéfiques de divers types de baies (cranberry, myrtille, fraise, mûre…), bien documentés, comprennent une puissante activité anti-inflammatoire et antioxydante dans des modèles cellulaires de neurotoxicité (Cásedas *et al.*, 2017). De plus, des études *in vivo* sur des animaux nourris avec un régime enrichi en baies ont rapporté des améliorations de la coordination motrice, des performances cognitives (mémoire spatiale, apprentissage), de la plasticité hippocampique et de la perte neuronale liée à l'âge (Casadesus *et al.*, 2004).

B. L'acide arachidonique

1. Acide arachidonique et alimentation

La plupart des graines cultivées et des huiles végétales, y compris les huiles de colza, de soja, de maïs et de tournesol, sont des sources majeures d'AGs ω-6 sous forme d'acide linoléique (AL), avec de faibles proportions d'AGs ω-3 sous forme d'acide α-linolénique (ALA). Contrairement aux AGs ω-6, l'apport en AGs ω-3 est généralement insuffisant en raison de leurs sources limitées (Moghadasian, 2008). Le rapport alimentaire recommandé en AGs ω-6/ω-3 pour les bienfaits pour la santé est de 5:1. Cependant, dans les régimes alimentaires occidentaux typiques, le rapport ω-6/ ω-3 était de 20:1 en 2016 (Simopoulos, 2016). Au cours des dernières décennies, le rapport ω-6/ω-3 dans le lait maternel humain a également augmenté. Ceci s'explique en raison des changements dans les graisses alimentaires maternelles, qui sont le déterminant essentiel de la prévalence croissante du surpoids et de l'obésité chez les enfants (Ailhaud & Guesnet, 2004).

L'ARA est retrouvé en majeure partie dans une alimentation à base de produits carnés mais un régime à base de poisson, d'huile de poisson (de morue notamment) et d'œufs peut également fournir de l'ARA (Tallima & El Ridi, 2017). Les poissons sauvages (marins) contiennent plus d'AGPI ω-3 que les poissons d'élevage puisque la plupart des poissons marins se nourrissent de phytoplancton et de zooplancton qui sont abondants en AGPI ω-3, tandis que les poissons d'élevage consomment des aliments à base d'huiles de céréales et végétales qui contiennent une proportion plus importante d'AGs ω-6. C'est pourquoi le projet CORDIS s'est penché sur une nourriture adaptée afin de favoriser l'apport en AGPI ω-3 chez les poissons d'élevage (Mega3Max). L'émergence de l'agro-industrie avec les aliments transformés, le bétail et les poissons nourris aux céréales, ainsi que l'hydrogénation et le raffinage des huiles végétales, avec une augmentation de l'huile de soja dans les préparations alimentaires ont réduit la teneur

en AGs ω-3 et augmenté celle en AGs ω-6 dans notre régime alimentaire occidental. Aux États-Unis, l'estimation des changements dans la consommation des AGs ω-3 et ω-6 au cours du XXe siècle a montré que la consommation d'huile de soja par habitant a été multipliée par 1000 entre 1909 et 1999 (Blasbalg *et al.*, 2011). La disponibilité de AL et de l'ALA est passée de 2,79 % à 7,21 % et de 0,39 % à 0,72 %, respectivement en 90 ans. De même, le rapport de AL/ALA est passé de 6,4 en 1909 à 10,0 en 1999 reflétant très nettement l'augmentation du ratio ω-6/ω-3 (Blasbalg *et al.*, 2011).

L'AL est un AGPI de la série ω-6 permettant la formation de l'ARA qui est un AGPI ω-6 de vingt atomes de carbone comprenant quatre doubles liaisons. Afin de former l'ARA, l'AL est pris en charge par différentes enzymes, la désaturase Δ6 afin de former l'acide γ-linolénique (C18 :3n-6). Par la suite, l'élongase 1 métabolise l'acide γ-linolénique aboutissant à la formation de l'acide dihomo-γ-linolénique (C20 :3n-6), ce dernier étant utilisé par la désaturase Δ5 afin de former l'ARA (C20 :4n-6) (*Figure 19*).

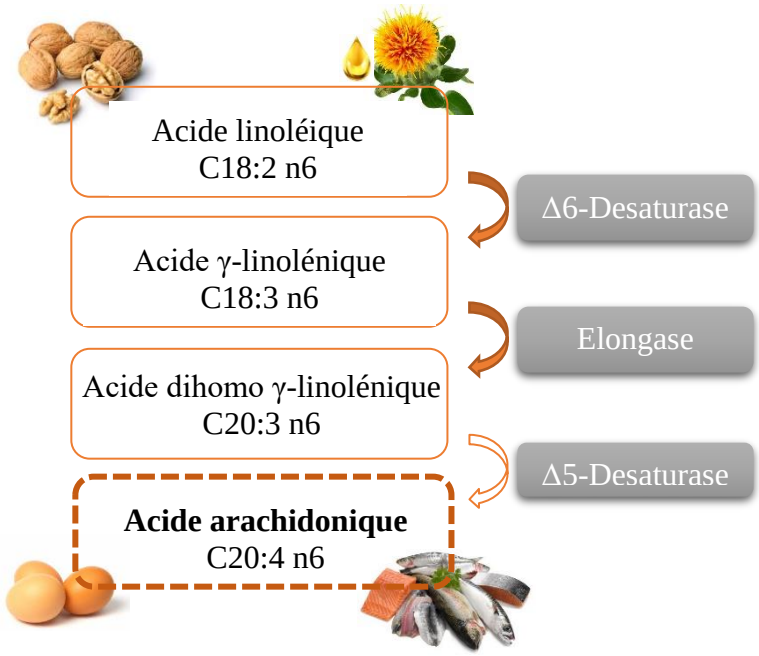


Figure 19 : Synthèse de l'ARA à partir de son précurseur, l'acide linoléique.

Afin de former l'ARA, l'AL est pris en charge par différentes enzymes, la desaturase 2 (ou Δ6) dans le but de former l'acide γ-linolénique puis par une élongase 1 (ou Δ5) pour former l'acide dihomo-γ-linolénique et enfin, une désaturase 1 métabolise cet acide dihomo-γ-linolénique pour aboutir à la formation de l'ARA.

L'ARA est le principal AGPI de type ω-6 dans les membranes cellulaires et le second AG le plus représenté dans le cerveau. Au niveau cellulaire, l'ARA peut être incorporé dans la membrane plasmique mais peut également agir directement sous forme non estérifiée en tant

que messager cellulaire. Peu d'études ont porté sur nos habitudes alimentaires et notamment les apports quotidiens en AG. Notamment, en 1992, le Comité scientifique européen de l'alimentation a révélé que 2 % de l'apport énergétique quotidien total pourrait provenir des AGPIs ω-6 et 0,5 % du ω-3 (Scientific comittee for food, 1993) soit à un apport d'AGPIs ω-6 à 6 $g.jour^{-1}$ et d'AGPIs ω-3 à 2 $g.jour^{-1}$ pour l'homme adulte. L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA pour *European Food Safety Authority*) a complété ces déclarations en mentionnant certains apports en AGs ω-3 et ω-6 en indiquant notamment qu'un régime doit être composé à 2 $g.jour^{-1}$ d'ALA et à 10 $g.jour^{-1}$ d'AL (EFSA 2010). Durant les années 1990, une batterie d'études a estimé que les apports quotidiens en ARA se situeraient dans une fourchette comprise entre 100 et 200 $mg.jour^{-1}$ (pour revue voir Pinchaud *et al.*, 2018). Ce large éventail rend difficile la détermination des teneurs en ARA dans les aliments actuellement consommés, d'autant plus que certains travaux mentionnent la sous-estimation des apports quotidiens d'ARA, au moins dans le régime américain (Taber *et al.*, 1998). L'ARA peut avoir de nombreux effets sur les fonctions physiologiques et est impliqué dans la susceptibilité à la MA (Thomas *et al.*, 2017). Nous décrivons dans les parties suivantes les différentes implications de l'ARA.

2. Acide arachidonique et effets cellulaires

L'ARA dans sa forme non estérifiée, et par conséquent biodisponible, peut être converti par plusieurs voies enzymatiques en de nombreux métabolites pouvant influencer les fonctions cérébrales et/ou le développement d'une neuroinflammation. La libération de l'ARA des phospholipides membranaires médiée par les phospholipases A_2 (PLA_2), est indispensable à ses fonctions physiologiques et sa conversion enzymatique.

Les PLA_2 clivent spécifiquement les liaisons ester en position sn-2 des phospholipides pour libérer un AG et un lysophospholipide (Farooqui *et al*., 2000). A ce jour, plus de trente enzymes ont été identifiées et classées dans cinq groupes distincts : les PLA_2 sécrétés ($sPLA_2$), les PLA_2 cytosoliques ($cPLA_2$), les PLA_2 calcium-indépendantes, les PLA_2 lysosomales et les *Platelet Activating Factor Acetylhydrolases* (Schaloske & Dennis, 2006). Contrairement aux autres types de phospholipases, la $cPLA_2$ libère préférentiellement l'ARA (Yamashita *et al*., 1997). Lorsque la $cPLA_2$ est activée (par phosphorylation ou par le calcium intracytosolique), elle est transportée du cytosol vers la membrane où elle clive sélectivement les phosphatidylcholines dans le golgi et le réticulum endoplasmique (Sun *et al.*, 2010). Les

phosphatidylcholines contiennent de l'ARA qui est libéré par la $cPLA_2$ et dont la majorité est réacyclé dans les phospholipides et la minorité est métabolisée.

Chez les mammifères, les AGs doivent être activés en acyl-CoA pour être estérifiés et incorporés dans les phospholipides. La synthèse d'acyl-CoA est catalysée par une acyl-CoA synthétase à partir d'AG, d'ATP et du CoA (Cho *et al.,* 2000). La classification des acyl-Coa synthétases se base sur la longueur de la chaîne carbonée des AGs qu'elles activent. A ce titre, les acyl-CoA synthétases à courte chaîne agissent sur les AGs de 2 à 4 carbones, tandis que celles à chaîne moyennes activent les AGs de 4 à 12 carbones et les acylCoA synthétases à longue chaîne (ACSL) sont spécifiques des AGs de 12 à 22 carbones (Soupene & Kuypers, 2008). Actuellement, cinq isoformes d'ACSL ont été identifiés, (ACSL1 et ACSL3 à 6) chez le rongeur et l'homme. Parmi ces isoformes, l'ACSL4, fortement exprimée dans les tissus stéroïdogènes (glandes surrénales, ovaires ou testicules) mais aussi dans le cerveau (cervelet et hippocampes), utilise préférentiellement l'ARA comme substrat (Cao *et al.,* 2000; Cho *et al.,* 2000; Kan *et al.,* 2014). Il s'agit d'une protéine membranaire retrouvée majoritairement au niveau des membranes associées aux mitochondries, des peroxisomes et microsomes (fragments de membrane du réticulum endoplasmique) (Liu *et al.,* 2011; Meloni *et al.,* 2009). L'ACSL4 spécifique du cerveau a 41 acides aminés supplémentaires comparé à l'isoforme présent dans les autres tissus (Cho, 2012) et est impliquée dans le développement des cellules neuronales ainsi que leur différenciation (Cho, 2012; Meloni *et al.,* 2009). Il a également été montré que l'ACSL4 régule le transport des vésicules synaptiques et serait donc nécessaire au développement, à la fonction et à la transmission synaptique (Liu *et al.,* 2011) et possède un rôle également dans le fonctionnement physiologique du cerveau, particulièrement de la mémoire et de l'apprentissage (Cao *et al.,* 2000).

Les lysophospholipides acyltransférases permettent de catalyser le transfert des AGs entre un acyl-CoA donneur et un lysophospholipide accepteur. Les lysophospholipides acyltransférases sont classées selon la nature de la tête polaire du lysophospholipide : lysophosphatidylcholine acyltransférase, lysophosphatidylinositol acyltransférase, lysophosphatidyléthanolamine acyltransférase et lysophosphatidylsérine acyltransférase, chacun possédant plusieurs isoformes. Chacun de ces types de phospholipides acyltransférases possède une préférence pour différents acyl-CoA, ce qui contribue à la diversité des membranes. Parmi ces lysophospholipides acyltransférases, la lysophosphatidylcholine acyltransférase 3 (LPCAT3) et la phosphatidylinositol acyltransférase 1 (LPIAT1) ont montré une spécificité pour l'ARA (Hishikawa *et al.,* 2008; Yamashita *et al.,* 1997).

Les LPCAT3 possèdent une activité acyltransférase vers les lysophosphatidylcholines, les phosphatidylethanolamines et lysophosphalidylsérines avec une préférence pour l'accepteur lysophosphatidylcholine (Shindou *et al.*, 2013). Cette enzyme a également montré une préférence pour les acyl-CoA tels que l'arachidonyl-CoA ou encore le linoléyl-CoA, avec une plus forte spécificité pour l'arachidonyl-CoA (Hishikawa *et al.*, 2008; Pérez-Chacón *et al.*, 2010). Lorsque la LPCAT3 est induite, cela a pour effet de diminuer les taux d'ARA libres en augmentant son incorporation dans les phospholipides membranaires et notamment dans les phosphatidylcholines (Eto *et al.*, 2012). Cette enzyme que l'on retrouve dans le réticulum endoplasmique est fortement exprimée dans les organes tels que le foie, le pancréas, le tissu adipeux et le cerveau (Yamashita *et al.*, 2014). La LPIAT1 quant à elle, utilise spécifiquement les phosphatidylinositols comme accepteurs d'acyl et l'arachidonyl-CoA comme donneur d'acyl afin de former des phosphatidylinositol contenant l'ARA (Yamashita *et al.*, 2014; Zarini *et al.*, 2014) (*Figure 20*).

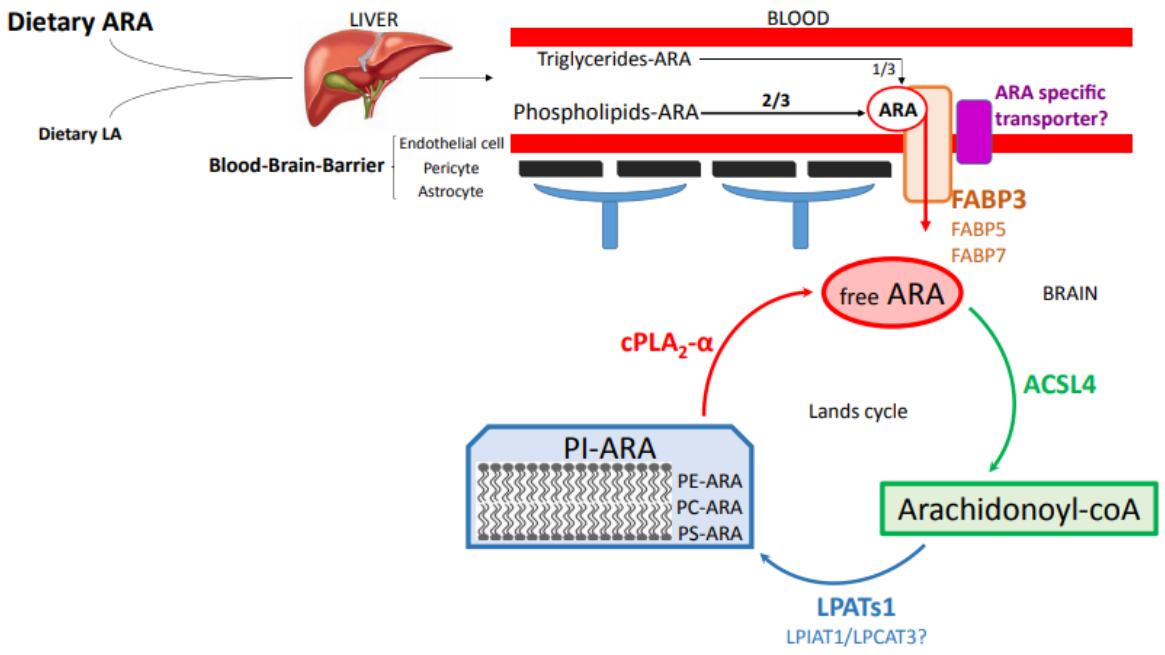


Figure 20 : Protéine de transport et enzymes impliquées dans le transport et l'incorporation de l'acide arachidonique dans le cerveau.

ARA, acide arachidonique ; LA, acide linoléique ;cPLA$_2$-α cytosolique, phsopholipase A$_2$ cytosolique ; ACSL4, acyl-CoA synthétase 4 ; FABP, protéine de liaison aux acides gras ; LPIAT1, lysophosphatidylinositol acyltransférase-1 ; LPCAT3, lysophosphatidylcholine acyltransférase-3 ; LPLAT, lysophospholipide acyltransférase ; PI-ARA, acide arachidonique contenant du phosphatidylinositol PE, phosphatidyléthanolamine ; PC, phosphatidylcholine ; PS, phosphatidylsérine. D'après Thomas et al., 2016.

L'ARA non estérifié est converti en une série de métabolites appelés eicosanoïdes (car ils possèdent tous 20 carbones) par l'intermédiaire d'une cascade enzymatique, nommée la cascade de l'ARA. Une fois libéré à partir de la position sn-2 des phospholipides membranaires par les PLA_2, l'ARA est métabolisé par trois enzymes dont il est le substrat majeur : les cyclooxygénases (COX), les lipoxygénases (LOX) et la cytochrome P450 époxygénase (CYP EPOX). Les COX catalysent la formation de prostaglandines (PG) et de thromboxanes (TX), les LOX quant à elles, catalysent la formation de leucotriènes (LT) et de lipoxines et la CYP EPOX produit l'acide epoxyeicosatriénique (EET) (*Figure 21, p.96*) (Funk, 2001; Stables & Gilroy, 2011).

Les COXs sont des enzymes liées à la membrane jouant un rôle central dans l'inflammation. Bien que ces enzymes convertissent l'acide γ-linolénique, l'acide eicosapentaénoïque et le DHA, leur substrat préférentiel est l'ARA (Phillis *et al*., 2006). Les COX sont des enzymes biofonctionnelles possédant deux sites catalytiques. La première fonction oxygénase ajoute deux molécules d'oxygène à l'ARA pour former la PGG_2 instable qui est ensuite transloquée au deuxième site catalytique ayant une fonction peroxydase et transformant la PGG_2 en PGH_2 qui elle est plus stable (*Figure 21, p.96*) (Chandrasekharan & Simmons, 2004; Kulmacz 1998). La PGH2 est par la suite métabolisée en PG ou en TXA2 par les PG synthétases tissulaire et cellulaire spécifiques. Les PG synthases que sont la PGE2 synthase, prostacycline (PGI2) synthase, PGD2 synthase et PGF2α synthase peuvent posséder plusieurs isoformes (Jakobsson *et al.,* 1999; Meirer *et al.,* 2014). Les PG produites par ces enzymes sont des médiateurs lipidiques possédant des fonctions biologiques variées pouvant parfois être antagonistes (Pecchi *et al.,* 2009). Les PG exercent leur action de façon spécifique au type cellulaire en se liant à plusieurs récepteurs de surface cellulaire couplés aux protéines G. A ce jour, neuf types de RCPG ont été identifiés : DP1 et 2 fixant la PGD2, EP1 à 4 fixant la PGE2, FP fixant la PGF2α, IP fixant la PGI2 et TP fixant TXA2 (Funk 2001; Stables & Gilroy, 2011). Il existe deux isoformes de COX : la COX-1 et la COX-2 qui sont des homodimères situés dans les membranes du réticulum endoplasmique et du noyau. Elles diffèrent par leurs gènes, leurs mécanismes de régulation, leur localisation et leur fonction (Aïd & Bosetti, 2011). La COX-2, qui possède un site actif plus large et plus flexible permet de concevoir une plus grande production d'eicosanoïdes lorsque les concentrations en ARA sont faibles (Kurumbail *et al.,* 1996; Phillis *et al.,* 2006; Rink & Khanna, 2011). Dans le cerveau, les COX-1 et 2 sont constitutivement exprimées. En conditions physiologiques, la COX-1 se trouve au niveau des dendrites postsynaptiques et des terminaisons excitatoires, en particulier dans le cortex et les hippocampes et permet le maintien des fonctions physiologiques de base

et l'homéostasie dans la synthèse des PG (Hoozemans *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005). La COX-1 est impliquée dans la production de PGs dans la phase initiale de l'inflammation aigüe tandis que la COX-2 est surexprimée quelques heures après (Milatovic *et al.*, 2011; Smyth *et al.*, 2009). La COX-2 est un élément clé dans la réponse inflammatoire aigüe et joue un rôle important dans de nombreux processus physiopathologiques. Cette enzyme peut aussi bien posséder des effets bénéfiques et protecteurs que des effets néfastes et toxiques sur les neurones selon le stimulus initié et la cible. Elle est induite dans la majorité des tissus par l'intermédiaire de stimuli inflammatoires et est considérée comme le seul isoforme capable de diffuser la réponse inflammatoire (Meirer *et al.*, 2014; Milatovic *et al.*, 2011; Rink & Khanna, 2011; Smyth *et al.*, 2009). Dans le cerveau, la COX-2 est également impliquée dans l'activité synaptique et la consolidation de la mémoire (Hewett *et al.*, 2006).

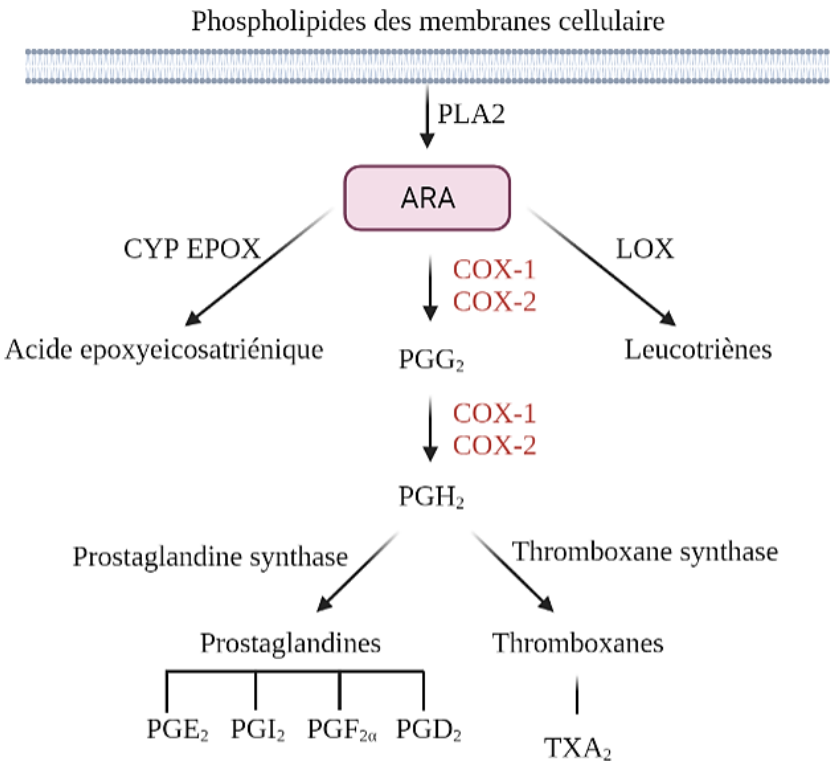


Figure 21 : Métabolisme de l'ARA et synthèse des eicosanoïdes.

D'après Aïd & Bosetti, 2011. Figure réalisée avec BioRender.

Il existe 4 LOXs classifiées selon la position du carbone sur lequel elles oxydent l'ARA : le 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX et 15-LOX. Au niveau cérébral, uniquement les 5-, 12- et 15-LOX ont été retrouvées avec une plus forte abondance que la 12-LOX (Phillis *et al.*, 2006). Les LOXs produisent des acides hydroperoxyeicosatetraénoïques (HPETE) à partir de l'ARA (Rink

& Khanna, 2011), métabolisés par la suite en composés plus stables, les acides hydroxyeicosatetraénoïques (HETE) et les LTs (Hambrecht *et al*., 1987; Meirer *et al.*, 2014; Rinaldo-Matthis & Haeggström, 2010). La 5-LOX est une enzyme clé de la cascade des LTs dont elle catalyse deux étapes de leur biosynthèse. La 5-LOX, activée par la *5-LOX Activating Protein* (FLAP), une protéine membranaire homotrimérique (Meirer *et al.*, 2014; Phillis *et al.*, 2006; Rinaldo-Matthis & Haeggström, 2010) synthétise le LTA4 à partir du 5-HPETE. Le LTA4 est très instable et facilement hydrolysé en LTB4 par la LTA4 hydrolase ou encore conjugué avec le glutathion par la LTC4 synthase pour produire le LTC4. Le LTC4 a la possibilité d'être transporté hors de la cellule grâce à la protéine MRP1 (*Multidrug-Resistance-Associated Protein*) et métabolisé en LTD4 et LTE4 (Haeggström & Funk, 2011; Meirer *et al.*, 2014; Rink & Khanna, 2011). La translocation de la 5-LOX à parti du cytosol vers la membrane nucléaire et son activation sont médiées par le niveau intracellulaire de calcium (Rinaldo-Matthis & Haeggström, 2010). Les LTs fonctionnent via des RCPG dont 4 récepteurs ont été clonés : deux au LTC4, LTD4 et LTE4 et deux au LTB4. Le LTB4 possède une grande affinité pour un des deux récepteur, le récepteur BLT1 qui est exprimé dans les cellules inflammatoires (*Figure 22*).

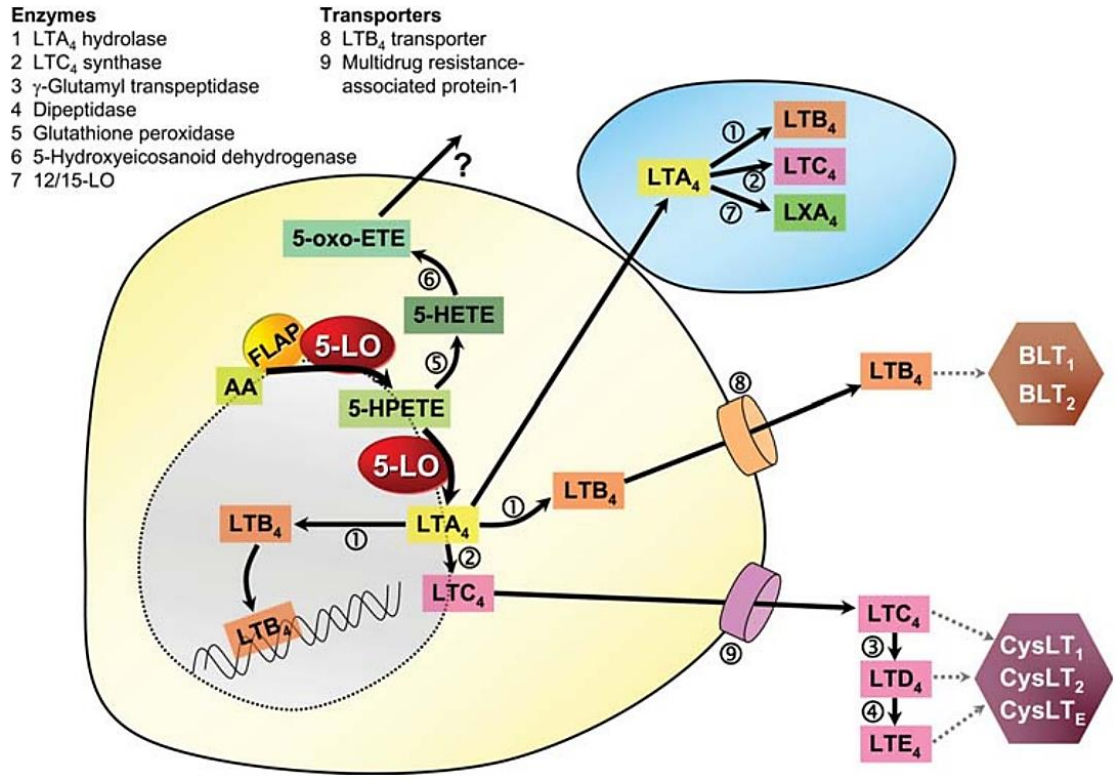


Figure 22 : Biosynthèse et signalisation dans la voie 5-lipoxygénase / leucotriène.

Une cellule inflammatoire synthétise des médiateurs lipidiques LT qui sortent de la cellule via des transporteurs spécifiques, pour l'activation des récepteurs LTB4 (BLT1 / BLT2) ou des récepteurs cysLT pour les LTC4, LTD4, LTE4 (CysLT1 / CysLT2 / CysLTE). Alternativement, LTA4 peut subir un métabolisme transcellulaire (cellule bleue). AA : acide arachidonique ; H (P) ETE : hydro acide (pero) xyeicosatétraénoïque; ETE : acide eicosatétraénoïque; FLAP : protéine d'activation 5-LO; LXA4 : lipoxine A4. D'après Poeckel & Funk 2010.

La CYP EPOX est une enzyme liée à la membrane et localisée dans le cerveau avec une plus forte expression dans les astrocytes), le rein, le cœur le poumon et le système cardiovasculaire (Meirer *et al.,* 2014). Elle métabolise l'ARA en insérant un atome d'oxygène au niveau d'une des doubles liaisons de l'ARA afin de former les EET (Rink & Khanna, 2011) qui sont peu stables et rapidement hydrolysés par l'époxyde hydrolase soluble en acide dihydroxyeicosatriénoique (DiHETE).

3. Acide arachidonique et microbiote intestinal

Il est généralement admis que la composition de notre bol alimentaire a un impact sur la composition du microbiote intestinal. A ce titre, une étude réalisée par Huang et ses collaborateurs en 2013 a montré que la source de lipides dans un régime module le microbiote intestinal. En utilisant différentes sources lipidiques, telles que la matière grasse du lait, le saindoux ou encore de l'huile de carthame dans la conception de régimes hyperlipidiques, les auteurs ont montré que la composition en AGs du régime alimentaire modifie le microbiote intestinal des souris et peut avoir un impact sur les profils inflammatoires et lipogéniques du tissu adipeux (Huang *et al.,* 2013). Ils ont ainsi observé par exemple que la matière grasse du lait ou l'huile de carthame (possédant en règle générale 70% de LA (Bozan & Temelli, 2008)), augmente la proportion de *Firmicutes* et diminue celle des *Bacteroidetes* comparé à un régime faible en lipides (Huang *et al.,* 2013) avec des modifications de l'expression génique de MCP-1 dans le tissu adipeux mésentérique (augmentation pour le régime comprenant la matière grasse du lait et diminution pour l'huile de carthame).

Très peu d'études ont été réalisées concernant les effets de l'ARA sur le microbiote intestinal. Cependant, l'étude pionnière de Zhuang et ses collaborateurs a montré qu'un régime enrichi en lipides à hauteur de 45% (kcal) et en ARA (1%) permet de moduler le microbiote intestinal chez la souris C57BL/6, de manière sexe-dépendante, et notamment de diminuer le ratio *Firmicutes*/*Bacteroides* chez des souris mâles (ratio couramment utilisé dans la littérature et dont les modifications sont impliquées dans différentes pathologies comme l'obésité (Magne *et al.,* 2020)) (Zhuang *et al.,* 2017). Par ailleurs, comparativement à un régime hyperlipidique non enrichi en ARA, l'enrichissement en ARA permet de diminuer la proportion en *Allobaculum*, *Oscillibacter*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* qui est négativement corrélée à l'obésité (Zhuang *et al.,* 2017). A l'inverse, le microbiote intestinal des souris mâles nourries avec un régime hyperlipidique et enrichi en ARA présente une augmentation de

Ruminococcus gnavus, *Mucispirillum schaedleriand*, *Alistipes*, initialement augmentés par le régime hyperlipidique non enrichi et corrélés positivement à l'obésité (Zhuang *et al.*, 2017). L'enrichissement en ARA a également augmenté la proportion en *Akkermansia muciniphila* associée à l'inflammation et à l'insulino-résistance (Zhuang *et al.*, 2017).

En revanche, chez la souris femelle nourrie avec le régime hyperlipidique et enrichi en ARA les auteurs ont observé une diminution similaire aux les souris mâles pour *Allobaculum*, *Oscillibacter*, *Bacteroides acidifaciens*, *Oscillospira* et *Clostridium IV*, mais ont mis en évidence une augmentation de *Barnesiella*, initialement diminuée par le régime hyperlipidique non enrichi et reconnue comme anti-inflammatoire (Zhuang *et al.*, 2017). Ils ont également souligné que l'enrichissement en ARA diminue la proportion en *Alistipes* et *Ruminococcus gnavus* chez les souris femelles, initialement augmentées par le régime enrichi en lipides et corrélées positivement à l'inflammation (Zhuang *et al.*, 2017). Ces mêmes souris ont également présenté une diminution des *Pseudomonas veronii* (associées à des pseudo-tumeurs inflammatoires intestinales) et *Akkermansia muciniphila* lorsqu'elles étaient nourries avec le régime hyperlipidique enrichi en ARA (Zhuang *et al.*, 2017).

En résumé, cette étude montre que l'impact de l'enrichissement en ARA dans un régime hyperlipidique sur la composition du microbiote intestinal et l'inflammation systémique est influencé par le sexe chez la souris C57BL/6. Les changements observés chez les souris mâles sont liés à l'inflammation et à l'obésité et donc à portée négative. En revanche, chez les souris femelles, l'enrichissement en ARA semble contrebalancer le statut pro-inflammatoire du microbiote intestinal des souris nourries avec le régime hyperlipidique non enrichi (Zhuang *et al.*, 2017). Les auteurs se sont également intéressés aux modifications des concentrations d'AGCCs dans le contenu caecal par chromatographie en phase gazeuse et ont observé une augmentation des niveaux d'acétate et une diminution des niveaux de butyrate chez les souris mâles nourries avec le régime hyperlipidique enrichi en ARA (Zhuang *et al.*, 2017). Le phénomène opposé a été mis en évidence chez les souris femelles, en raison de la diminution des bactéries productrices de butyrate, à savoir *Butyricimonas synergistica* et *Ruminococcus* (Zhuang *et al.*, 2017) confortant ainsi les résultats observés pour le microbiote intestinal et l'inflammation.

Les effets de l'ARA ont également été étudiés chez le poisson zèbre, où différents régimes enrichis avec une microalgue *Labosphaera incisa* non mutée ou mutée (Δ5-désaturase) et riche en ARA et en acide dihomo-γ-linolénique ont été administrés. Cette étude a montré qu'une supplémentation en microalgue, qu'elle soit mutée ou non mutée, a augmenté la proportion en *Actinobacteria* (également observable dans des modèles de souris obèses et chez

l'homme (Clarke *et al.*, 2012)). Cette étude a aussi mis en évidence une augmentation de l'expression génique de COX-2 et de LOX-1 dans l'intestin des poissons zèbres, ce qui suggère une conversion de l'ARA apporté au travers de l'alimentation en eicosanoïdes.

Les recherches présentées ci-dessus suggèrent un rôle modulateur de l'ARA sur le microbiote intestinal au travers de l'alimentation. En raison d'un faible nombre d'études sur l'impact de l'ARA dans différents contextes alimentaires sur le microbiote intestinal, il est important de compléter les données existantes et de déterminer si l'apport d'ARA au travers de l'alimentation favorise la survenue de la MA par modulation du microbiote intestinal et des différentes voies de l'axe microbiote-intestin-cerveau abordées précédemment.

4. Maladie d'Alzheimer et acide arachidonique

a. Rôle de l'ARA dans les fonctions synaptiques

L'ARA est impliqué dans la plasticité synaptique, dont la potentialisation à long terme est un élément clé. La potentialisation à long terme se produit lors de la mise en mémoire d'un souvenir qui se traduit par une augmentation importante et durable de l'efficacité synaptique et requiert l'activation des récepteurs NMDA au glutamate ainsi que l'entrée consécutive de calcium dans la cellule au niveau post-synaptique (Williams, 1996). Ce processus, dans sa phase initiale, est à l'origine d'une libération d'ARA libre couplée à une augmentation de l'activation de la PLA_2 (Clements *et al.*, 1991). Plusieurs études ont mis en avant le rôle de messager rétrograde de l'ARA puisque ce dernier permet, à la suite de sa libération, d'entretenir et d'amplifier le signal synaptique et ainsi de contribuer à la potentialisation à long terme (Lynch *et al.*, 1991). Les messagers rétrogrades sont générés par les neurones postsynaptiques afin de maintenir la libération de neuromédiateurs comme par exemple le glutamate, et de stimuler les changements synaptiques tels que la potentialisation à long terme (Bazan *et al.*, 1997; Schmitz *et al.*, 2014). Cette qualification de l'ARA comme messager rétrograde, est fondée sur différentes observations selon lesquelles l'ARA peut s'accumuler de manière calcium-dépendante dans la membrane présynaptique (Freeman *et al.*, 1990). Par la suite plusieurs processus peuvent s'opérer :

- l'ARA, libéré par la PLA_2, peut inhiber la recapture des neuromédiateurs afin d'augmenter leur concentration dans la fente synaptique. Ces neuromédiateurs, par liaison à leurs récepteurs post-synaptiques permettent ainsi d'amplifier la transmission synaptique (Katsuki & Okuda, 1995; Roseth *et al.*, 1998),

- l'ARA est également impliqué dans l'exocytose et la fusion de vésicules qui intervient dans le recyclage de transporteurs membranaires et des neuromédiateurs comme cela est expliqué dans le paragraphe suivant.

La communication neuronale nécessite un nombre suffisant de vésicules chargées de neuromédiateurs, prêtes à fusionner avec la membrane. Plusieurs protéines sont impliquées dans la sécrétion des neuromédiateurs via la fusion de vésicules synaptiques comme les protéines *Soluble N-Ethylmaleimide-Attachment Receptor* (SNARE) et Sec1/Munc18 (*Figure 23*).

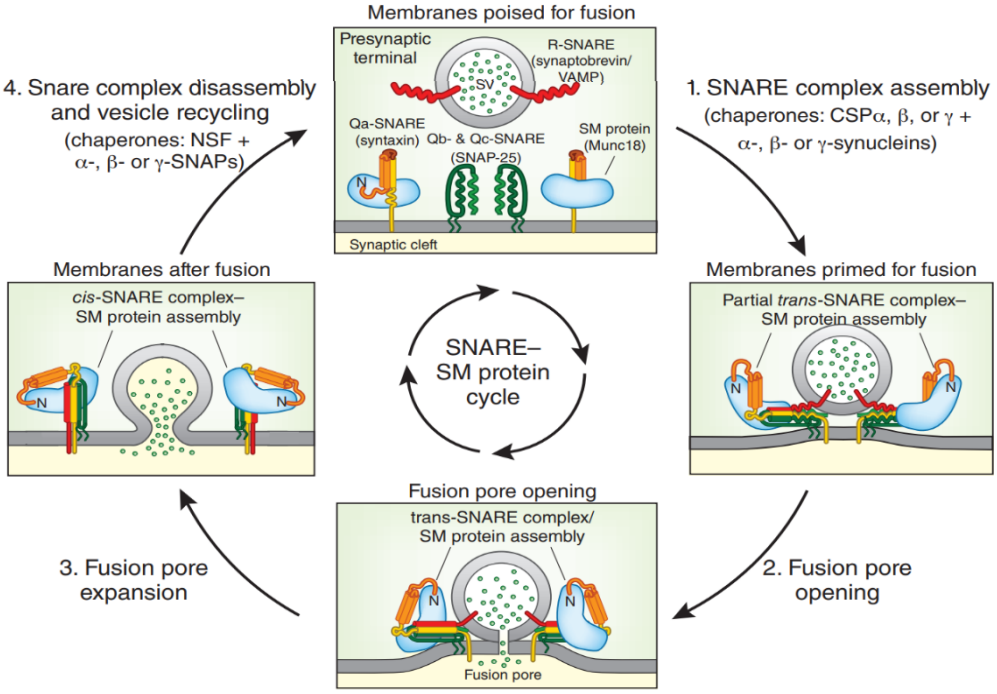


Figure 23 : Modèle du cycle protéique SNARE – Sec1/Munc18 lors de la fusion des vésicules synaptiques.

A l'étape 1, les vésicules synaptiques sont mises en place pour la fusion. Cette étape implique l'ouverture de la conformation fermée de la syntaxine, un passage de Munc18 de la conformation fermée à ouverte et l'assemblage partiel des complexes trans-SNARE. Cette étape est facilitée par des protéines chaperonnes (string cystéine (CSP) et synucléines) qui améliorent l'assemblage du complexe SNARE et dont le dysfonctionnement est lié à la neurodégénérescence. A l'étape 2, le pore de fusion s'ouvre, avec un assemblage complet du complexe trans-SNARE. A l'étape 3, le pore de fusion se dilate, convertissant le complexe trans-SNARE en complexe cis-SNARE. À l'étape 4, de nouvelles protéines chaperonnes interviennent dans le désassemblage du complexe SNARE, conduisant au recyclage des vésicules. Le cycle montré ici pour la fusion des vésicules synaptiques peut faire référence pour la majorité des réactions de fusion cytoplasmique. D'après Südhof, 2013.

Les protéines SNARE, engagées dans la fusion membranaire, sont sensibles à la présence de certains AGPIs et notamment à l'ARA, mais les AGs saturés n'ont aucun effet sur ces protéines (Connell *et al.*, 2007; Rickman & Davletov, 2005). Les protéines Munc18-1 et la syntaxine-1, dont l'interaction aboutit à l'arrimage des vésicules au niveau de la membrane

cible (Toonen *et al.,* 2006) sont identifiées comme cibles de l'ARA. En effet, l'ARA a la capacité d'activer les syntaxines sans association préalable à Munc18-1, permettant d'engager la synthaxine-1 dans un complexe SNARE (sans abolir l'association de Munc18-1 avec la synthaxine-1, étape indispensable pour que Munc18-1 puisse s'engager dans le complexe SNARE). La synthaxine-1 nécessite la présence d'ARA pour être totalement activée et accélérer l'assemblage du complexe SNARE. L'ARA peut ainsi stimuler les synapses actives au niveau de la membrane présynaptique en influençant la formation du complexe SNARE (Latham *et al.,* 2007). L'ajout d'ARA au niveau de la membrane synaptique suffit donc par conséquent à potentialiser la formation du complexe SNARE (Latham *et al.,* 2007). Cet assemblage en présence de Munc18-1 peut être induit également par ajout de PLA_2 au niveau de la membrane synaptique (Brown *et al*., 2003b).

b. Implication de la $cPLA_2$ et des prostaglandines synthases dans la MA

L'équipe du Pr. Olivier a été une des premières à mettre en évidence l'implication de la $cPLA_2$ dans la MA. Dès 2005, elle a montré sur des cultures primaires de neurones de rongeurs que les oligomères de peptides Aβ sont responsables d'une activation de la $cPLA_2$ et d'une augmentation de la libération d'ARA précoce et transitoire, dépendante des flux de calcium et de plusieurs kinases (PKC et ERK1/2). Il a également été montré que l'inhibition de l'activité (par des inhibiteurs pharmacologiques) ou de l'expression de la $cPLA_2$ (par des oligonucléotides antisens) réduit l'effet toxique, pro-apoptotique des oligomères de peptides Aβ (Kriem *et al*., 2005). Enfin, ces mêmes travaux ont mis en évidence que l'inhibition de la COX-2 diminue de 2/3 la mortalité induite par les peptides Aβ (Kriem *et al*., 2005).

L'implication des dérivés des sphingolipides (céramides, sphingosine, sphingosine-1-phosphate) dans le contrôle de l'apoptose a été démontrée dans de nombreuses études, en particulier dans le contexte des maladies neurodégénératives. Notre équipe a établi que les oligomères de peptides Aβ induisent l'apoptose en activant à la fois les sphingomyélinases acides et neutres. Le traitement des neurones embryonnaires en culture primaire avec des oligonucléotides antisens de la $cPLA_2$ a bloqué l'activation des sphingomyélinases par les peptides Aβ ce qui montre que l'activation de la $cPLA_2$ est un évènement précoce dans la voie de transduction pro-apoptotique. Enfin la sphingosine-1 phosphate et la sphingosylphosphorylcholine protègent les neurones contre l'effet toxique des oligomères de peptides Aβ en inhibant les sphingomyélinases acides ce qui permettrait d'envisager une stratégie thérapeutique basée sur l'utilisation de dérivés sphingolipidiques (Malaplate-Armand

et al., 2006). L'implication de la $cPLA_2$ a été confirmée *in vitro* (Shelat *et al*., 2008) et confirmée *in vivo* par notre équipe qui a utilisé un modèle d'injection intra-cérébroventriculaire (ICV) d'oligomères de peptides Aβ.

Une injection ICV d'oligomères de peptides Aβ a été réalisée sur des souris $cPLA_2^{-/-}$ afin de mettre en évidence le rôle de la $cPLA_2$. Cette étude a montré que les souris $cPLA_2^{-/-}$ présentent une résistance totale aux oligomères de peptides Aβ administrés par injection ICV et conservent leurs capacités mnésiques à court- et long-terme contrairement à leurs homologues de phénotype sauvage. Cette préservation des capacités cognitives est associée à un haut niveau d'expression des marqueurs synaptiques traduisant une conservation de la plasticité synaptique alors que celle-ci est fortement atteinte chez les animaux de phénotype sauvage (Desbène *et al.,* 2012). Aucune réaction inflammatoire n'a été observée dans ce modèle d'injection ICV d'oligomères de peptide Aβ, ce qui contraste avec une autre étude qui a croisé des souris $cPLA_2^{-/-}$ avec des souris hAPP-J20 exprimant une forme mutante de la protéine APP humaine (Sanchez-Mejia *et al.,* 2008). Cette dernière étude a rapporté la présence de grandes quantités d'eicosanoïdes pro-inflammatoires dans les cerveaux des animaux hAPP-J20 et a montré un ralentissement du déclin cognitif et des altérations synaptiques chez les souris $cPLA_2^{-/-}$/hAPP-J20. L'ARA libéré par la $cPLA_2$ neuronale peut influencer les fonctions synaptiques. Par ailleurs, il peut être converti par la COX-2 et la PGD2 synthase de type hématopoïétique (Mohri *et al.,* 2007) ou la PGES-1 microsomale (Akitake *et al.,* 2013; Girardet *et al.,* 2011) dont les expressions sont augmentées chez les modèles murins d'étude de la MA et chez les patients atteints par la MA. Ainsi l'expression de la PGES-1 est associée aux plaques amyloïdes dans le cortex de patients Alzheimer et de souris Tg2576 (Akitake *et al.,* 2013; Girardet *et al.,* 2011). Ce modèle murin de la MA montre une diminution de la prolifération microgliale autour des plaques amyloïdes et une atténuation des déficits d'apprentissage lorsque la PGES-1 microsomale est inactivée (Akitake *et al.,* 2013). Cependant, l'action de la PGE2 dans la MA peut être complexe puisque l'inactivation du récepteur E3 dans un modèle murin de MA conduit à une diminution de l'induction de gènes pro-inflammatoires, de la production de peptides Aβ et de l'altération des protéines présynaptiques (Shi *et al.,* 2012) tandis que l'inactivation du récepteur E4 au niveau microglial augmente l'expression des gènes inflammatoires et également le dépôt de peptides Aβ dans les phases précoce de la MA de ce modèle (Woodling *et al.,* 2014).

Chapitre 2 Problématique et objectifs.

“A la source de toute connaissance, il y a une idée, une pensée, puis l’expérience vient confirmer l’idée.”

Claude Bernard, Biologiste, Médecin, Physiologiste et Scientifique

L'équipe du Pr. Olivier a montré dans un travail de thèse antérieur qu'un régime contenant 1% d'ARA amplifie les effets neurotoxiques des oligomères de peptides Aβ, agent principal de la MA, chez la souris (Thomas *et al.*, 2017). Un modèle d'injection ICV d'une dose unique d'oligomères d'Aβ a été choisi afin d'induire un phénotype Alzheimer chez les animaux qui ont été nourris pendant 12 semaines avec deux régimes contenant 10% de lipides :

- Un régime dont la composition en AGs comportait 11% d'ARA (1% au total dans le régime), 20% d'AL (ω-6), 5% d'ALA et 1% de DHA (ω-3), 27% d'acide oléique et 1,5% d'acide palmitoléique (monoinsaturé), 11% d'acide palmitique et 22% d'acide stéarique (saturés),
- Un régime contrôle comportant 44% d'acide oléique et 15% d'AL c'est à dire plus riche en AGs monoinsaturés et plus pauvre en AGs de la série ω-6 sans ARA. Les compositions de ces régimes sont présentées dans la figure de la revue du *Chapitre 3* (Pinchaud *et al.*, 2018).

Après 10 semaines de consommation des deux régimes, une injection ICV d'oligomères de peptides Aβ ou de solution saline a été effectuée chez les souris et le comportement a été évalué durant les deux dernières semaines de régime. Cette étude a montré que la consommation d'ARA jusqu'au moment de l'injection ICV, n'a pas altéré les capacités cognitives des animaux. En revanche, les souris recevant le régime enrichi en ARA et l'injection ICV de peptides Aβ ont présenté par la suite une diminution des capacités d'apprentissage (piscine de Morris) comparativement aux souris nourries avec le régime contrôle. Cette altération de l'apprentissage coïncidait avec une diminution de l'expression hippocampique des récepteurs AMPA au glutamate et une prolifération astrocytaire (Thomas *et al.*, 2017).

Alors que de grandes différences de composition en AGs ont été observées dans les deux groupes de souris nourries par les deux régimes entre le début et la fin du protocole dans les érythrocytes et le foie, les compositions en AGs des tissus cérébraux ont présenté des modifications de bien moindre ampleur. Les mécanismes expliquant l'impact du régime contenant de l'ARA sur la sensibilité du cerveau à la neurotoxicité de peptides Aβ n'ont pu être étudiés dans ce travail antérieur. En outre, cette étude n'a pas comporté de groupes de souris avec un régime alimentaire conventionnel (5% de lipides et riche en AL) et la composition du régime contrôle divergeait du régime test enrichi en ARA par le contenu en acide oléique et AL. Ce présent travail de thèse s'inscrit donc dans la continuation des travaux antérieurs et s'est proposé d'évaluer les effets d'un apport alimentaire en ARA sur le microbiote, l'intestin et leur communication avec le cerveau.

A partir des connaissances publiées dans la littérature et des résultats antérieurs à l'équipe du Pr. Olivier, nous avons posé les hypothèses de travail suivantes :

1- L'apport alimentaire en ARA induit une inflammation de bas grade chronique au niveau des tissus périphériques par des modifications du microbiote intestinal et;
2- L'inflammation de bas grade périphérique provoquée par cet apport alimentaire d'ARA favorise l'apparition d'une neuroinflammation et majore les effets neurotoxiques d'agents inducteurs de la MA comme l'accumulation intracérébrale de peptides Aβ, les agents de stress mitochondrial ou les désordres vasculaires ;
3- Des agents probiotiques pourraient rétablir l'équilibre du microbiote intestinal et diminuer les niveaux inflammatoires périphériques.

A partir de ces hypothèses de travail, nous avons étudié l'effet d'un apport alimentaire en ARA (1%) sur la relation microbiote-intestin-cerveau dans une étude principale *in vivo* basée sur l'utilisation de trois régimes : un régime contrôle identique aux régimes conventionnels murins (5% de lipides) et deux régimes modérément hyperlipidiques comportant 15% de lipides dont un contenant uniquement de l'AL comme AG de la série ω-6 et l'autre contenant 1% d'ARA pris sur la proportion en AL. Les objectifs de cette étude ont été les suivants:

- Objectif n°1 : Déterminer si un apport alimentaire en ARA dans un contexte modérément hyperlipidique engendre des modifications du microbiote intestinal.
- Objectif n°2 : Déterminer si cet apport alimentaire et cette dysbiose se traduisent par une altération de la barrière intestinale et une inflammation de bas grade dans le tissu colique, les tissus adipeux et le foie.
- Objectif n°3 : Déterminer si les phénomènes précédents conduisent à l'altération de la BHE et à une neuroinflammation.

Afin d'évaluer les capacités de souches de bactéries probiotiques à inverser les modifications induites par une consommation alimentaire d'ARA couplée à un modèle de la MA, nous avons également réalisé une autre étude préliminaire. Les objectifs de cette étude ont été les suivants :

- Objectif n°1 : Déterminer *in vitro* si les bactéries probiotiques peuvent survivre dans une matrice d'eau gélifiée (HydroGel®) durant un temps suffisant pour rendre possible leur administration aux souris.
- Objectif n°2 : Déterminer *in vivo* si les bactéries probiotiques testées peuvent survivre dans le TGI durant 48h en administration conjointe avec différents régimes alimentaires

durant un temps suffisant pour rendre possible leur administration aux souris et l'apparition d'effets biologiques.

- Objectif n°3 : Evaluer *in vivo* un modèle d'administration orale de D-galactose au moyen d'HydroGel® afin de créer un stress oxydatif chronique et l'apparition d'une neurotoxicité.

L'ensemble de ces études sont présentées en *Chapitre 4* et *5* de ce manuscrit de thèse. Outre ces objectifs précédemment décrits, une des finalités de ce projet financé par l'Association France Alzheimer est d'évaluer le potentiel des probiotiques sur la sensibilité à la MA dans un contexte de consommation alimentaire riche en ARA. Afin de préparer au mieux les différents protocoles expérimentaux de ce projet, ce travail de thèse a débuté par une solide lecture de la bibliographie amenant à la rédaction d'une revue scientifique parue dans OCL. Cet exercice de synthèse est présenté en *Chapitre 3* de ce manuscrit.

Chapitre 3 :

“Dietary arachidonic acid: a Janus face actor in brain and Alzheimer’s brain?”

“Toute science est une connaissance certaine et évidente.”

René Descartes, Mathématicien, Philosophe, Physicien et Scientifique

"Dietary arachidonic acid: a Janus face actor in brain and Alzheimer's brain?"

K. Pinchaud, K. Maguin-Gaté, J-L. Olivier.

Article publié dans Oilseeds & Fat Crops and Lipids en Mai 2018 à l'issu de la conférence « Lipids & Brain IV : Lipids in Alzheimer disease » en Octobre 2017.

La MA est une maladie neurodégénérative associée au vieillissement et constitue à ce jour un problème de santé publique majeur grandissant dans le monde. De nombreuses études ont montré que les oligomères de peptides Aβ en sont désormais reconnus comme l'agent principal, bien que la présence de la protéine tau ne soit nécessaire à leur action. Malgré ce constat, il n'y a actuellement aucun traitement efficace ni de moyen reconnu de prévention de cette maladie. Depuis plusieurs années, notre mode de vie est directement impliqué dans ce constat, notamment au travers d'une dégradation de notre alimentation. A ce titre, l'identification de facteurs de risques alimentaires semble être une piste intéressante à explorer. La mise en évidence d'un lien entre consommation alimentaire d'ARA (retrouvée dans les produits carnés) et la MA permettrait par la suite d'envisager des moyens de préventions prometteurs. L'ARA est le second AGPI cérébral et le premier de la série des ω-6. Les apports alimentaires d'ARA varient entre 50 et 300 $g.jour^{-1}$ dans les régimes occidentaux mais pourraient être sous-estimés. Avec d'autres auteurs, nous avons établi que la phospholipase A_2 cytosolique, spécifique de l'ARA, assure les effets neurotoxiques des oligomères de peptides Aβ. Nous avons ensuite montré qu'un régime riche en ARA augmente la sensibilité des souris aux effets de ces oligomères, sans augmentation majeure de ses niveaux cérébraux. Ceci suggère que cet AG peut agir sur le cerveau par des effets périphériques comme une sub-inflammation dont le rôle dans la relation intestin-cerveau est discutée dans la littérature. Les apports alimentaires en ARA devraient être intégrés dans la prévention de la MA.

OCL 2018, 25(4), D406
© K. Pinchaud *et al.*, Published by EDP Sciences, 2018
https://doi.org/10.1051/ocl/2018033

Topical issue on:
LIPIDS & BRAIN IV: LIPIDS IN ALZHEIMER'S DISEASE
LIPIDS & BRAIN IV: LES LIPIDES DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER

OCL Oilseeds & fats Crops and Lipids

Available online at:
www.ocl-journal.org

REVIEW

OPEN ACCESS

Topical Issue

Dietary arachidonic acid: a Janus face actor in brain and Alzheimer's disease?

Katleen Pinchaud[1], Katy Maguin-Gaté[1] and Jean-Luc Olivier[1,2,*]

[1] Composés Alimentaires, BIofonctionnalités et NeurOTOXicité (CALBINOTOX, EA7488), Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, Boulevard des Aiguillettes, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
[2] Service de Biochimie-Biologie moléculaire, CHU de Nancy,24 avenue du Mal de Lattre de Tassigny, CO n° 34, 54018 Nancy, France

Received 2 March 2018 – Accepted 28 May 2018

Abstract – Arachidonic acid is the second polyunsaturated fatty acid in brain and the first one belonging to the ω-6 series. Dietary intakes of arachidonic are between 50 and 300 mg/day in western diets but they might be underestimated. Triglycerides from fat would provide similar amounts than phospholipids of lean meat. Alzheimer's disease is an age-associated degenerative disease and a critical health concern worldwide. Amyloid-β peptide oligomers are presently recognized as the main and earliest agents of Alzheimer's disease although their neurotoxicity requires the presence of tau protein. We and others established that the arachidonic-specific cytosolic phospholipase A_2 is critical for the amyloid-β peptide oligomer neurotoxicity. Then, we showed that an arachidonic acid-rich diet increases the mouse sensitivity to the amyloid-β peptide oligomer deleterious effect without major increase of arachidonic acid levels in brain. This suggests that dietary arachidonic acid can exert its effects in brain through peripheral modifications. Involvement of systemic sub-inflammation and gut-brain communications are discussed based on the recent literature. The various data suggest that dietary arachidonic acid should be taken into account in the design of preventive strategies against Alzheimer's disease.

Keywords: arachidonic acid / inflammation / brain / diet / Alzheimer's disease

Résumé – L'acide arachidonique alimentaire : un acteur à deux faces dans le cerveau et la maladie d'Alzheimer ? L'acide arachidonique est le second acide gras polyinsaturé cérébral et le premier de la série des ω-6. Les apports alimentaires d'acide arachidonique varient entre 50 et 300 mg/jour dans les régimes occidentaux mais pourraient être sous-estimés. Les triglycérides de la partie grasse des viandes fourniraient des quantités similaires aux phospholipides de la partie maigre. La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative associée à l'âge et un problème de santé publique majeur dans le monde. Les oligomères de peptides β amyloïde en sont désormais reconnus comme l'agent principal, bien que la présence de la protéine tau est nécessaire à leur action. Avec d'autres auteurs, nous avons établi que la phospholipase A_2 cytosolique, spécifique de l'acide arachidonique, assure les effets neurotoxiques des oligomères de peptide β amyloïde. Nous avons ensuite montré qu'un régime riche en acide arachidonique augmente la sensibilité des souris aux effets de ces oligomères, sans augmentation majeure de ses niveaux cérébraux. Ceci suggère que cet acide gras peut agir sur le cerveau par des effets périphériques comme une sub-inflammation dont le rôle dans la relation intestin-cerveau est discutée dans la littérature. Les apports alimentaires d'acide arachidonique devrait être intégrés dans la prévention de la maladie d'Alzheimer.

Mots clés : acide arachidonique / inflammation / cerveau / régime alimentaire / maladie d'Alzheimer

*Correspondence: jean-luc.olivier@univ-lorraine.fr, jl.olivier@chru-nancy.fr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abbreviations

AD	Alzheimer's disease
AICD	Activation-induced cell death
APP	Amyloid precursor protein
ARA	Arachidonic acid
Aβ peptide	Amyloid-beta peptide
BACE 1	Beta-secretase 1 precursor
CD33	Cluster of differentiation 33
CD36	Cluster of differentiation 36
cPLA2	Cytosolic phospholipase A2
DHA	Docosahexaenoic acid
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
LDL	Low density *lipoprotein*
LNA	Linoleic acid
NFT	Neurofibrillary tangles
PSD95	Postsynaptic density *protein* 95
PUFAs	Polyunsaturated fatty acids
SNAP25	Synaptosomal-associated protein 25
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
TLR	Toll-like receptor
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2

1 Introduction

While the influence of docosahexaenoic acid [DHA] in Alzheimer's disease [AD] or other neurodegenerative diseases focused the interest of scientific and medical communities, few works were devoted to the role of arachidonic acid [ARA] in these diseases. However, ARA is the second polyunsaturated fatty acids [PUFA] and the main member of the ω-6 series in brain, representing approximately 20% of the neuronal fatty acids. In addition, ARA is converted in various eicosanoid which are important mediators in the various phases of inflammation, having pro- or anti-inflammatory activities and is involved in synaptic transmission as retrograde messenger (Nishizaki *et al.*, 1992) and regulator of SNARE formation (Rickman and Davletov, 2005). Furthermore, ARA is considered as an essential fatty acid at least in the maturation of brain in the pre- and post-natal periods.

It is well admitted that memory alterations are caused by synaptic dysfunctions in the AD early steps. Neuro-inflammation contributes to the AD early synaptic dysfunctions and the neuronal death in the late steps of the disease. Therefore, ARA is putatively involved in AD through its role in synaptic signal and in inflammatory process and regulation of its brain levels could be a target in the fight against AD occurrence and progression. Despite its putative role in the maintenance of brain functions, excessive dietary ARA intake could lead to higher brain incorporation and favour dysregulation of ARA mobilization and conversion into pro-inflammatory mediators. However, ARA content in western diets were poorly studied until now, which makes difficult the evaluation of their impact on AD risk.

We will first examine, in this review, the present knowledge about the ARA place in the current western diets. After a short overview about the AD molecular actors of AD and the role of neuro-inflammation, we will present recent data about ARA contribution to AD mechanisms including ours. On this basis, we will propose some hypothesis on the ARA-associated mechanisms in AD.

Table 1. Evaluation of dietary arachidonic acid intakes. Few studies evaluated ARA dietary intakes in a limited number of countries and reported a large range of values.

Sources	Range
Jonnalagadda *et al.*, 1995	100 mg/day
Mann *et al.*, 1995	< 150 mg/day
Tokudome *et al.*, 1999	139–168 mg/day
Kuriki *et al.*, 2002	130–150 mg/day

2 Arachidonic acid in the current western diets

Several studies were performed in the 1990s to evaluate the ARA daily intake in the western diets and its main sources in food. According to these studies, ARA daily intakes are in a wide range from 100 to 200 mg/day (Jonnalagadda *et al.*, 1995; Mann *et al.*, 1995). Studies on Japanese population reported a narrower but compatible range of values between 100 and 200 mg/day (Tokudome *et al.*, 1999; Kuriki *et al.*, 2002). This wide range of daily intakes (see Tab. 1 for comparison of the various studies) in western diets could make difficult the determination of ARA contents in currently consumed foods as suggested by some works about the ARA underestimation at least in American diet (Taber *et al.*, 1998). ARA is provided directly from some food components such as red meat, chicken, eggs but also fish (http://appliedresearch.cancer.gov/diet/foodsources/fattyacids/table4.html, data from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005–2006 USA). For example, a recent study established that ARA plasma concentration is associated with the consumption of red meat in the Singapore Chinese population (Seah *et al.*, 2017). Although membrane phospholipids are frequently considered as the main source of ARA, Li *et al.* (1998) reported that meat fat and triglycerides provide similar or even higher ARA amounts especially in white meat, chicken or pork. The case of chicken or other poultry has to be considered since they are frequently consumed in many countries and higher ARA content in poultry improve the taste of the meat (Kiyohara *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2012). Methods of raising and feeding poultries could therefore increase dietary ARA intakes in humans.

ARA also results from the conversion of its precursor linoleic acid [LNA], i.e. the elongation by elongases and desaturation by Δ and Δ6 desaturases. LNA is much more abundant in human food than ARA. The European Food Safety Authority [EFSA]) recommended in 2009 the consumption of 2 g/day of α-linolenic acid and 10 g/day of LNA (European Food Safety Authority, 2009) which corresponded to an increase of the previous recommendations for ω-3 and ω-6 daily intakes (2 g/day and 6 g/day respectively in 1992). In parallel, the World Health Organization recommended that 0.5–2% and 2.5–5% of energy should be provided by ω-3 and

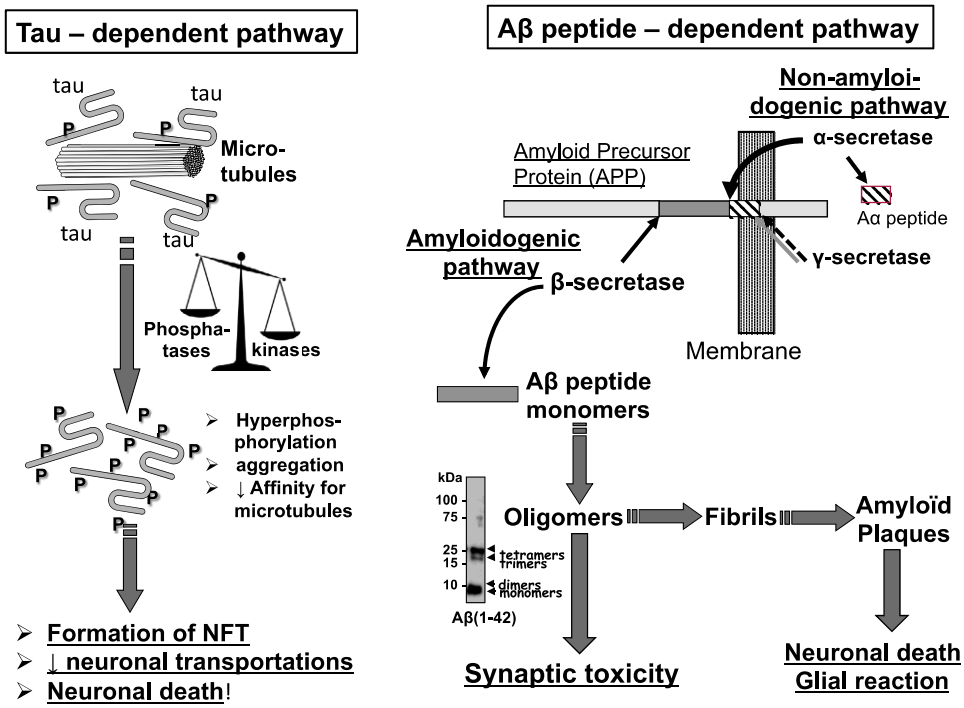


Fig. 1. Roles of tau and Aβ oligomers in AD. The tau-dependent pathway is associated to hyperphorylation and aggregation of tau-proteins inducing alterations of neuronal transportations and finally, neuronal death. The Aβ peptide-dependent pathway is associated to Aβ peptide production and toxic oligomer formation which alter synaptic functions. In a final step, Aβ peptide oligomers aggregate into amyloid plaques from oligomers which contribute to glial reaction and neuronal death.

ω-6 PUFAs, respectively (i. e. 1.5–6 g/day and 7.5–15 g/day of ω-3 and ω-6 PUFAs, respectively) (FAO/WHO, 2008). In France, the National Individual study on Alimentary Consumptions [INCA] showed that the French people eat on average 9 g/day of LNA (ω-6) and 0.9 g/day of linolenic acid (ω-3) while the US daily average intakes are 18 g and 2 g of LNA and linolenic acid, respectively, according the 2012 USDA study (USDA, 2012). A few studies investigated the rate of conversion of consumed LNA into ARA in adults and their data indicated that this conversion poorly contributes to the ARA amounts found in plasma or in liver (Adam *et al.*, 2008). On the contrary, the brain ARA requirement of the fetal baboon are met by dietary maternal LNA (Su *et al.*, 1999), which suggest that the brain development period must be considered separately from what happen in adult organism. Additional worldwide studies are needed to provide more precise evaluation of the daily ARA intake, the LNA contribution to the ARA amounts found in peripheral organs as well in brain and the main food sources of ARA.

3 Main molecular actors of Alzheimer's disease and contribution of neuro-inflammation

AD was originally defined in 1906 by Aloïs Alzheimer by the presence of two histological pathognomonic signs in brain of affected patients:

– neurofibrillary tangles (NFTs);
– amyloid plaques (Berrios, 1990).

Neurofibrillary tangles are formed by aggregation of hyperphosphorylated tau protein filaments while amyloid plaques result from aggregation of amyloid-β [Aβ] peptide (Fig. 1). Tau protein physiologically associates to microtubules in mature neurons and play an important role in neuronal signalling and axonal transport (Nisbet *et al.*, 2015; Chong *et al.*, 2018). Hyperphosphorylation of tau in AD probably result from a disequilibrium between kinase (CDK5, GSK3β, ERK2 and/or other still unidentified kinases) and phosphatase activities (Gong *et al.*, 2000) and facilitate the formation of tau helical filaments which finally aggregate into NFTs. In addition, hyperphosphorylation of tau decrease its affinity for microtubules which drastically alters the axonal transportations (Iqbal *et al.*, 1994). The importance of tau dysregulation is highlighted by the correlation between the clinical symptoms and the extension of NFTs through the various brain regions (the entorhinal cortex in the earliest steps, then in the limbic system and the hippocampus the neocortex in the latest stages of AD) (Silverman *et al.*, 1997).

The amyloid plaques are formed by aggregates of amyloid-β [Aβ] peptide. The Aβ peptide is produced by the amyloidogenic cleavage of the transmembrane amyloid precursor protein [APP] which function is still unknown. In this amyloidogenic way, the N-terminal portion of APP is

cleaved by the major β-secretase BACE1 while the C-terminal portion of APP is cleaved by the γ-secretase, both the cleavage releasing the Aβ peptide and two other N-terminal (sAPPβ) and C-terminal (AICD) fragments (Vassar *et al.*, 1999). There are two major forms of Aβ peptide: $A\beta_{1\text{-}40}$, which is the most abundant form (90%) and $A\beta_{1\text{-}42}$ (10%), which is the most toxic form. Since the clinical symptoms are not correlated with the number and size of the amyloid plaques (Lue *et al.*, 1999), many authors concluded in the early 2000s that amyloid plaques is not the engine of the pathological process but a late symptoms. They postulated that the Aβ oligomers, formed by the Aβ peptides before their fibrillization and deposition into plaques, are the initial agent of AD. This hypothesis is presently largely recognized since numerous studies demonstrated that these Aβ oligomers induce early synaptotoxicity and damages to neuronal networks, leading to memory impairment (Gong *et al.*, 2003; Lacor *et al.*, 2007; Shankar *et al.*, 2008). Despite numerous works, the relationship between tau and Aβ peptide oligomers is still poorly known. Several studies established that the pathological effects induced by the Aβ peptide oligomers required the presence of intact tau (Vossel *et al.*, 2010; Mairet-Coello *et al.*, 2013). Although it is still a subject of debate, Aβ peptide oligomers appear as the earliest and more specific AD agents since tau alterations are observed in many other neurodegenerative diseases (Lebouvier *et al.*, 2017).

One of the main question emerging from the tremendous numbers works on AD and Aβ peptide oligomers is the root cause of intracerebral accumulation of these oligomers in AD since there is no clear evidence of Aβ peptide overproduction in sporadic AD cases (> 99% of the AD cases) on the contrary to the genetic cases < 1% of the cases). Dysregulations of neuro-inflammatory processes could at least contribute to this accumulation. The importance of neuroinflammation in AD is supported by the findings of associations between AD and genes coding for immune receptors, such as TREM2 (Guerreiro *et al.*, 2013) and CD33 (Griciuc *et al.*, 2013). Microglial cells, which are major actors in neuroinflammation with astrocytes, recognize Aβ peptide oligomers through the binding to the cell-surface toll like receptors (Walter *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012). Stewart *et al.* described that TLR-4 and −6 form heterodimers able to bind Aβ peptide as well as oxidized LDL and associate with CD36 to generate cytokine production and inflammation (Stewart *et al.*, 2010). Why microglial or astroglial cells are unable to eliminate Aβ peptide and impede accumulation of Aβ oligomers and plaque formations is still unknown. Whether neuroinflammation is just reactive to the presence of undesirable Aβ peptide oligomers or whether an active contributor to AD pathological processes is also an opened question. But many recent data highlighted neuroinflammation as an important actor and a therapeutic target against AD (Ardura-Fabregat *et al.*, 2017).

4 Arachidonic acid in brain functions and Alzheimer's disease: an essential lipid or a pathological agent?

ARA is usually considered as an essential fatty acid especially for brain development in association with DHA. To date, few studies provided some evidenced to support this hypothesis. Since ARA and its precursor LNA are very abundant in human food and maternal milk, no drastic deficiency has been described on the contrary to DHA, which is 10–20-fold less abundant. Some studies in humans or in primates indicated that blood ARA levels are not influenced by diet on the contrary to DHA in humans (Ghebremeskel *et al.*, 2000; Diau *et al.*, 2005; Lauritzen *et al.*, 2015) and suggested that DHA/ARA ratio is strictly maintained (Ghebremeskel *et al.*, 2000). However, a slower growth has been observed in case of low ARA levels (Ghebremeskel *et al.*, 2000). Several studies performed on rodents indicated that maternal ARA supplementation could compensate the alterations of cognitive abilities in pups induced by maternal metabolic diseases such as streptozotocin-induced diabetes (Zhao *et al.*, 2011) and diet/APO-E*3 leiden genotype-induced obesity (Arnoldussen *et al.*, 2016). A decrease of obesity was observed in the APO-E*3 leiden adult mice with a combination of ARA and DHA supplementation but not with DHA alone (Wielinga *et al.*, 2012). Studies on Δ6 desaturase knockout mice showed that supplementation with both DHA and ARA are necessary to compensate the PUFAs deficiencies in brain and the effects on motor activity and coordination during development (Hatanaka *et al.*, 2016; Harauma *et al.*, 2017). But, long-term administration of ARA in adult mice maintained under ω-3 deficient diet increases the severity of motor coordination alterations indicating that preservation of adequate DHA intake are necessary in any case (Harauma *et al.*, 2015). It is important to emphasize that sex should be considered for these studies about dietary lipid intake and brain functions since brain lipid composition and diet influence differ in male and female mice (Rodriguez-Navas *et al.*, 2016).

Higher dietary ARA intakes or ARA diet supplementation counteract the reduction of cognition and synaptic activity which are observed in healthy aged rodents (McGahon *et al.*, 1997; McGahon *et al.*, 1998; Kotani *et al.*, 2003; Okaichi *et al.*, 2005). An ARA positive effect has also been reported on neurogenesis in rodent hippocampus (Tokuda *et al.*, 2014) but it is difficult to transpose these data in humans whose neurogenesis is weak especially during aging. On the contrary, we observed a negative influence of dietary ARA in a murine AD model. We previously showed that Aβ oligomers activate, in neuronal cells, cytosolic phospholipase A_2 ($cPLA_2$) which specifically releases ARA from membrane phospholipids (Kriem *et al.*, 2005). We then showed that cognitive abilities and expression of the synaptic proteins PSD95 and SNAP25 are preserved in $cPLA_2^{-/-}$ mice after an intracerebroventricular injection (ICV) of Aβ oligomers while they are drastically altered in wild-type mice after this treatment (Desbène *et al.*, 2012). By breeding $cPLA_2^{-/-}$ mice and transgenic AD model mice overproducing Aβ peptide, Sanchez-Mejia *et al.* (2008) also showed that the reduction of $cPLA_2$ reduce the neurotoxicity of Aβ peptides. Since $cPLA_2$ specifically hydrolyze ARA containing phospholipids, we assumed that higher dietary ARA intakes could lead to higher ARA brain incorporation and favor its release by Aβ peptide oligomer-activated $cPLA_2$. Therefore, we studied the effects of a single ICV of Aβ peptide oligomers in mice fed with a 1% ARA containing diet for 12 weeks (Thomas *et al.*, 2017). We also used a control diet in which oleic acid replaced ARA (see Fig. 2 for the experimental layout of this study). Both ARA-rich and control diets contained adequate amounts

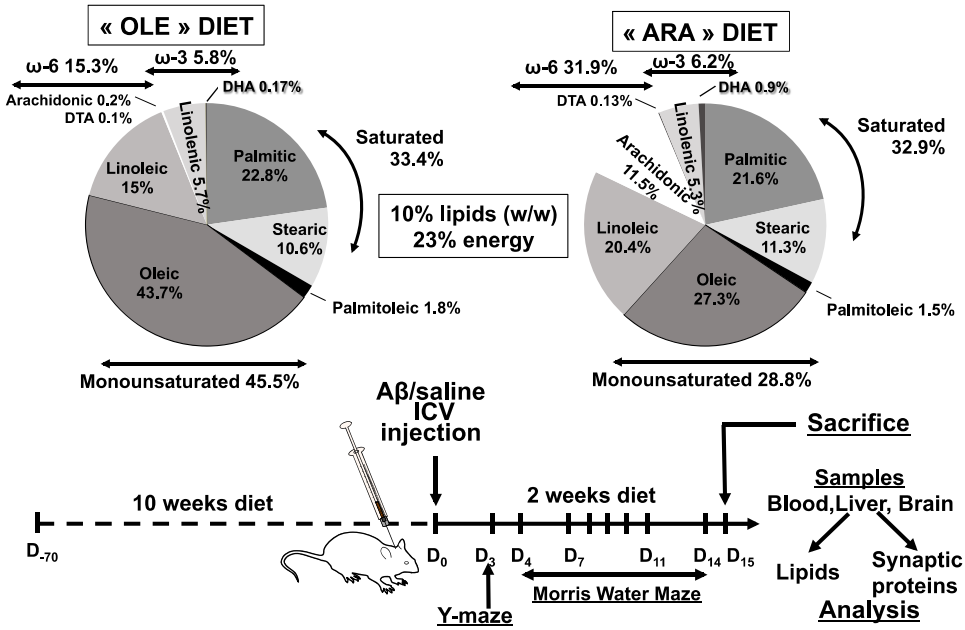


Fig. 2. Experimental layout of Thomas *et al.* (2017) study. In this study, two groups groups of mice were fed for 12 weeks either with an oleic acid rich diet (control OLE diet) or an ARA-rich diet (ARA diet). The two diets contained similar amounts of saturated and ω-3 fatty acids. In the OLE diet, oleic acid replace the excess of ω-6 fatty acids (mainly ARA). At week 10, the two groups of mice were submitted to intracerebroventricular injections of Aβ(1-42) peptide oligomers or saline solution (control). Congitive abilities were measured by using the Y-maze (short term memory) and the Moorris Water maze (long term memory) tests. Mice were sacrificed at the end of week 12 and blood, liver and brain samples were collected for protein (synaptic proteins in brain) and lipid analyses.

of DHA and linolenic acid for murine needs. We observed a drastic reduction of learning abilities, reduction of AMPA receptor expression levels and increase of the astrocytic marker GFAP expression after Aβ peptide oligomer ICV in mice fed with the ARA-rich diet compared to the control group. These negative effects of dietary ARA are consistent with those of Amtul *et al.* (2012) who reported that a 2% ARA containing diets increased of $A\beta_{1\text{-}42}$ production and deposition in transgenic AD-model CRND8 mice after 21 weeks. By contrast, Hosono *et al.* (2015a, 2015b) described an improvement of cognitive alterations and a reduction of amyloid plaques by supplementation with ARA in 17-month-old Tg2576 mice. The authors did not observe the same positive results with DHA supplementation. But in this transgenic AD-model, the Aβ peptide overproduction due to mutant human APP overexpression leads to massive amyloid deposition and drastic alterations of cognitive abilities before the age of 12 months. In the early step of sporadic AD, there is no evidence of Aβ peptide overproduction and memory alterations are not caused by amyloid plaque formation but to the synaptotoxicity of Aβ oligomers. Our single Aβ oligomer ICV model is supposed to reproduce this early synaptoxicity (Youssef *et al.*, 2008). The two groups (Hosono *et al.*, 2015a, 2015b; Amtul *et al.*, 2012) who studied the effects of dietary ARA did not show any result about the modification of brain lipids and/or ARA brain incorporation. In our study, we measure reproducible but small increase of ARA levels in ARA diet-fed mice. This minor increase compared to the large modifications that we observed in blood and liver, do not support the existence of a drastic release of free ARA in brain and its direct influence on brain inflammation or synaptic functions. Dietary ARA could increase the brain sensitivity to Aβ oligomer toxicity through the transmission of inflammatory signals from the peripheral compartment to brain (see Tab. 2 for the comparison of the studies on the role of dietary ARA).

5 Dietary arachidonic acid: an actor of chronic sub-inflammation from gut to brain?

The role of acute or chronic systemic inflammation in the AD progression emerged quite recently in literature and was initially focused on the circulation of pro-inflammatory cytokines (Holmes *et al.*, 2009) The usually admitted dogma that increased ARA levels increase eicosanoid production was supported by some works (Whelan *et al.*, 1993; Whelan *et al.*, 1997) but this eicosanoid production is not automatically associated to cytokine secretion (Kelley *et al.*, 1997). Dietary ARA has been mainly involved in two chronic pathologies in which inflammation plays a critical role: bowel disease and obesity. Conversion of arachidonic acid into pro-inflammatory leukotriene was early recognized as a key event in Bowel disease (Nielsen *et al.*, 1987). But more recent works indicated that dietary ARA is rather protective against colitis progression (Ramakers *et al.*, 2008; Knoch *et al.*, 2010). ARA might favour obesity by acting on the differentiation of brite adipocytes which are energy-dissipating cells (Pisani *et al.*, 2014). In addition, ARA impairs hypothalamic leptin signal, thus

Table 2. Experimental features and main data of the previous studies on the role of arachidonic acid in AD. We previously showed the mice in which the expression of the main ARA releasing enzyme $cPLA_2$ has been suppressed, are resistant to the neurotoxicity of the Aβ peptide oligomers. By contrast, an ARA-rich diet increase the sensitivity of the mice to the neurotoxicity of the Aβ peptide oligomers. Two other teams studied the role of dietary ARA and reported conflicting results.

Sources	Main experimental features	Main experimental data
Desbène *et al.*, 2012	$cPLA_2^{-/-}$ mice	→ cognitive abilities in $cPLA_2^{-/-}$ mice
	ICV injection of Aβ peptides	→ PSD95 and SNP25 in $cPLA_2^{-/-}$ mice
Thomas *et al.*, 2017	Balb/c mice	↘Learning abilities
	1% ARA diet for 12 weeks	↘AMPA Receptors
	ICV injection of Aβ peptides	↗GFAP
Amtul *et al.*, 2012	CRND8 mice	↗$A\beta_{1-42}$ production and deposition
	2% ARA diet for 21 weeks	
Hosono *et al.*, 2015a, 2015b	Tg2576 mice	↘Cognitive alteration
	ARA Supplementation of the diet 4%	↘Amyloid plaques

promoting obesity (Cheng *et al.*, 2015). However, there is still a debate about the ARA influence on obesity-associated inflammation (Suitor *et al.*, 2017). The role of intestinal microbiota should be considered to reconcile the various data on dietary ARA effects on systemic chronic sub-inflammation in obesity, Bowel disease or chronic pathologies pro-inflammatory. For example, Zhuang *et al.* (2017) recently showed that dietary ARA favour obesity and by acting on the hypothalamus-liver-adipocytes axis but the effect is modulated by sex and intestinal microbiota, female mice being less pejoratively affected. This result should be related to the current work on the relationship between the gut microbiota and Alzheimer's disease (for review see Jiang *et al.*, 2017). Therefore, the role of gut microbiota, gut-brain communications, systemic inflammation and its transmission to brain through the blood-brain barrier should be further investigated to design preventive strategies against AD (Fig. 3).

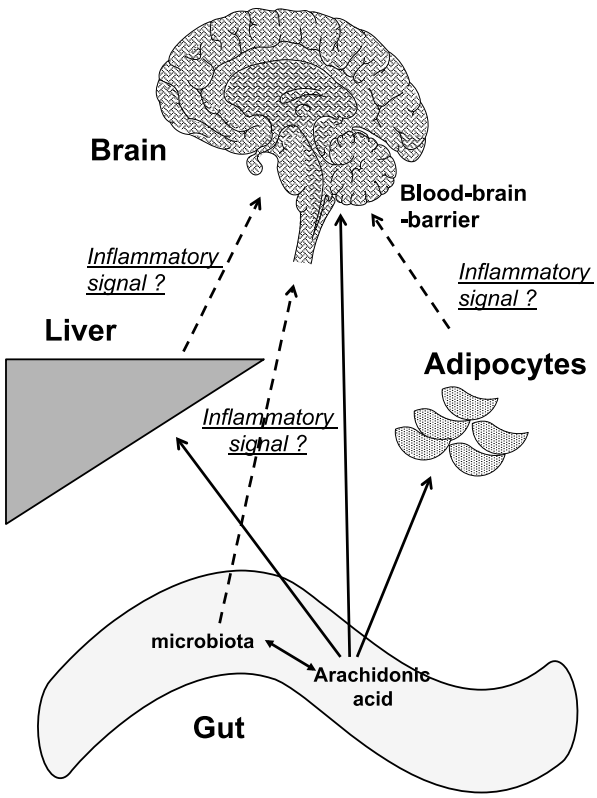


Fig. 3. Putative roles of gut-brain communications, gut microbiota and systemic inflammation in the dietary arachidonic acid effects on the sensitivity to the Aβ peptide oligomer neurotoxicity. ARA has an impact directly or indirectly on the brain. An ARA-rich diet can modify the composition of intestinal microbiota to induce inflammatory mediators and thus, have effects on the Aβ peptide oligomer neurotoxicity. Indeed, arachidonic acid can affect the brain by going liver, adipocytes and inflammatory mediators.

5 Conclusion

AD prevention is a critical challenge to stop the increasing AD prevalence worldwide. Nutrition is one of the main tools in preventive strategies, but risk factor must be more precisely characterized. On this point of view, ARA contribution to western diet and AD risk should be more extensively studied. Several preclinical works including ours suggest that ARA could favour AD occurrence and progression although other studies indicated that ARA could play a positive role in physiological aging. Additional studies are required on the various mechanisms induced by high dietary intakes including modulation of inflammation, modification of the gut microbiota, influence on the gut-blood and blood-brain barriers. It is noticeable that a correlation between ARA and cholesterol consumption and higher risk of occurrence of Parkinson's disease has been reported in the japan population (Miyake *et al.*, 2010) which suggest that dietary ARA could be a target in preventive strategies against other neurodegenerative diseases.

Acknowledgements. We thank the France-Alzheimer association and the Region Loraine for their financial support to the works performed by the group and presented in this review.

Conflicts of interest. The authors declare that they have no conflicts of interest in relation to this article.

References

Adam O, Tesche A, Wolfram G. 2008. Impact of linoleic acid intake on arachidonic acid formation and eicosanoid biosynthesis in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79: 177–181.

Amtul Z, Uhrig M, Wang L, Rozmahel RF, Beyreuther K. 2012. Detrimental effects of arachidonic acid and its metabolites in cellular and mouse models of Alzheimer's disease: structural insight. *Neurobiol Aging* 33: 831.e21–831.e31.

Ardura-Fabregat A, Boddeke EWGM, Boza-Serrano A, *et al.* 2017. Targeting neuroinflammation to treat Alzheimer's disease. *CNS Drugs* 31: 1057–1082.

Arnoldussen IA, Zerbi V, Wiesmann M, *et al.* 2016. Early intake of long-chain polyunsaturated fatty acids preserves brain structure and function in diet-induced obesity. *J Nutr Biochem* 30: 177–188.

Berrios GE. 1990. Alzheimer's disease: a conceptual history. *Int J Ger Psychiatry* 5: 355–365.

Cheng L, Yu Y, Zhang Q, Szabo A, Wang H, Huang XF. 2015. Arachidonic acid impairs hypothalamic leptin signaling and hepatic energy homeostasis in mice. *Mol Cell Endocrinol* 412: 12–18.

Chong FP, Ng KY, Koh RY, Chye SM. 2018. Tau proteins and tauopathies in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol*, in press.

Desbène C, Malaplate-Armand C, Youssef I, *et al*. 2012. Critical role of cPLA2 in Aβ oligomer-induced neurodegeneration and memory deficit. *Neurobiol Aging* 33: 1123.e17–1123.e29.

Diau GY, Hsieh AT, Sarkadi-Nagy EA, Wijendran V, Nathanielsz PW, Brenna JT. 2005. The influence of long chain polyunsaturated fatty acid supplementation on docosahexaenoic acid and arachidonic acid in baboon neonate central nervous system. *BMC Med* 3: 11.

European Food Safety Authority. 2009. Scientific opinion: labelling reference intake values for n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *EFSA J* 1176: 1–11.

FAO/WHO. 2008. Interim summary of conclusions and dietary recommendations on total fat & fatty acids, in expert consultation on fats and fatty acids in human. Geneva, pp. 10–14.

Ghebremeskel K, Crawford MA, Lowy C, *et al.* 2000. Arachidonic and docosahexaenoic acids are strongly associated in maternal and neonatal blood. *Eur J Clin Nutr* 54: 50–56.

Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2000. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 275: 5535–5544.

Gong Y, Chang L, Viola KL, *et al.* 2003. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10417–10422.

Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, *et al.* 2013. Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* 78: 631–643.

Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, 2013. *et al.* TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368: 117–127.

Harauma A, Tomita M, Muto D, Moriguchi T. 2015. Effect of long-term administration of arachidonic acid on n-3 fatty acid deficient mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 95: 41–45.

Harauma A, Yasuda H, Hatanaka E, Nakamura MT, Salem N Jr, Moriguchi T. 2017. The essentiality of arachidonic acid in addition to docosahexaenoic acid for brain growth and function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 116: 9–18.

Hatanaka E, Harauma A, Yasuda H, *et al.* 2016. Essentiality of arachidonic acid intake in murine early development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 108: 51–57.

Holmes C, Cunningham C, Zotova E, *et al.* 2009. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* 73: 768–774.

Hosono T, Mouri A, Nishitsuji K, *et al.* 2015a. Arachidonic or docosahexaenoic acid diet prevents memory impairment in Tg2576 Mice. *J Alzheimers Dis* 48: 149–162.

Hosono T, Nishitsuji K, Nakamura T, *et al.* 2015b. Arachidonic acid diet attenuates brain Aβ deposition in Tg2576 mice. *Brain Res* 1613: 92–99.

INCA 2. Étude Individuelle Nationale sur les Consommations Alimentaires. 2006–2007.

Iqbal K, Alonso AC, Gong CX, Khatoon S, Singh TJ, Grundke-Iqbal I. 1994. Mechanism of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 9: 119–123.

Jiang C, Li G, Huang P, Liu Z, Zhao B. 2017. The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 58: 1–15.

Jonnalagadda SS, Egan SK, Heimbach JT, Harris SS, Kris-Etherton PM. 1995. Fatty acid consumption paterns of Americans: 1987–1988 SDA Nationwide Food Consumption Survey. *Nutr Res* 15: 1767–1781.

Kelley DS, Taylor PC, Nelson GJ, Schmidt PC, Mackey BE, Kyle D. 1997. Effects of dietary arachidonic acid on human immune response. *Lipids* 32: 449–456.

Kiyohara R, Yamaguchi S, Rikimaru K, Takahashi H. 2011. Supplemental arachidonic acid-enriched oil improves the taste of thigh meat of Hinai-jidori chickens. *Poult Sci* 90: 1817–1822.

Knoch B, Barnett MP, McNabb WC, *et al.* 2010. Dietary arachidonic acid-mediated effects on colon inflammation using transcriptome analysis. *Mol Nutr Food Res* 54(Suppl. 1): S62–S74.

Kotani S, Nakazawa H, Tokimasa T, *et al.* 2003. Synaptic plasticity preserved with arachidonic acid diet in aged rats. *Neurosci Res* 46: 453–461.

Kriem B, Sponne I, Fifre A, *et al.* 2005. Cytosolic phospholipase A_2 mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid-beta peptide. *FASEB J* 19: 85–87.

Kuriki K, Nagaa T, Imaeda N, *et al.* 2002. Discrepancies in dietary intakes and plasma concentrations of fatty acids according to age among Japanese female dietitians. *Eur J Clin* 56: 524–531.

Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, *et al.* 2007. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27: 796–807.

Lauritzen L, Fewtrell M, Agostoni C. 2015. Dietary arachidonic acid in perinatal nutrition: a commentary. *Pediatr Res* 77: 263–269.

Lebouvier T, Pasquier F, Buée L. 2017. Update on tauopathies. *Curr Opin Neurol* 30: 589–598.

Li D, Ng A, Mann NJ, Sinclair AJ. 1998. Contribution of meat fat to dietary arachidonic acid. *Lipids* 33: 437–440.

Liu S, Liu Y, Hao W, *et al.* 2012. TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid β peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J Immunol* 188: 1098–1107.

Lue L, Kuo YM, Roher AE, *et al.* 1999. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155: 853–862.

Mairet-Coello G, Courchet J, Pieraut S, *et al.* 2013. The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of Aβ oligomers through Tau phosphorylation. *Neuron* 78: 94–108.

Mann NJ, Johnson LG, Warrick GE, Sinclair AJ. 1995. The arachidonic acid content of the Australian diet is lower than previously estimated. *J Nutr* 125: 2528–2535.

McGahon B, Clements MP, Lynch MA. 1997. The ability of aged rats to sustain long-term potentiation is restored when the age-related decrease in membrane arachidonic acid concentration is reversed. *Neuroscience* 81: 9–16.

McGahon B, Murray CA, Clements MP, Lynch MA. 1998. Analysis of the effect of membrane arachidonic acid concentration on modulation of glutamate release by interleukin-1: an age-related study. *Exp Gerontol* 33: 343–354.

Miyake Y, Sasaki S, Tanaka K, *et al.* 2010. Dietary fat intake and risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. *J Neurol Sci* 288: 117–122.

Nielsen OH, Ahnfelt-Rønne I, Elmgreen J. 1987. Abnormal metabolism of arachidonic acid in chronic inflammatory bowel disease: enhanced release of leucotriene B4 from activated neutrophils. *Gut* 28: 181–185.

Nisbet RM, Polanco JC, Ittner LM, Götz J. 2015. Tau aggregation and its interplay with amyloid-β. *Acta Neuropathol* 129: 207–220.

Nishizaki T, Nomura T, Matsuoka T, Tsujishita Y. 1992. Arachidonic acid as a messenger for the expression of long-term potentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 254: 446–449.

Okaichi Y, Ishikura Y, Akimoto K, *et al.* 2005. Arachidonic acid improves aged rats' spatial cognition. *Physiol Behav* 84: 617–623.

Pisani DF, Ghandour RA, Beranger GE, *et al.* 2014. The ω6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway. *Mol Metab* 3: 834–847.

Ramakers JD, Mensink RP, Verstege MI, te Velde AA, Plat J. 2008. An arachidonic acid-enriched diet does not result in more colonic inflammation as compared with fish oil- or oleic acid-enriched diets in mice with experimental colitis. *Br J Nutr* 100: 347–554.

Rickman C, Davletov B. 2005. Arachidonic acid allows SNARE complex formation in the presence of Munc18. *Chem Biol* 12: 545–553.

Rodriguez-Navas C, Morselli E, Clegg DJ. 2016. Sexually dimorphic brain fatty acid composition in low and high fat diet-fed mice. *Mol Metab* 5: 680–689.

Sanchez-Mejia RO, Newman JW, Toh S, *et al.* 2008. Phospholipase A_2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 11: 1311–1318.

Seah JY, Gay GM, Su J, *et al*. 2017. Consumption of red meat, but not cooking oils high in polyunsaturated fat, is associated with higher arachidonic acid status in Singapore Chinese adults. *Nutrients* 9. pii: E101.

Shankar GM, Li S, Mehta TH, *et al.* 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14: 837–842.

Silverman W, Wisniewski HM, Bobinski M, Wegiel J. 1997. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* 18: 389–392.

Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, *et al.* 2010. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* 11: 155–161.

Su HM, Corso TN, Nathanielsz PW, Brenna JT. 1999. Linoleic acid kinetics and conversion to arachidonic acid in the pregnant and fetal baboon. *J Lipid Res* 40: 1304–1312.

Suitor K, Payne GW, Sarr O, *et al.* 2017. Arachidonic acid promote white adipose tissue inflammation in Fads2−/− mice fed low fat diets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 126: 84–91.

Taber L, Chiu CH, Whelan J. 1998. Assessment of the arachidonic acid content in foods commonly consumed in the American diet. *Lipids* 33: 1151–1157.

Takahashi H, Rikimaru K, Kiyohara R, Yamaguchi S. 2012. Effect of arachidonic acid-enriched oil diet supplementation on the taste of broiler meat. *Asian-Australas J Anim Sci* 25: 845–851.

Thomas MH, Paris C, Magnien M, *et al.* 2017. Dietary arachidonic acid increases deleterious effects of amyloid-β oligomers on learning abilities and expression of AMPA receptors: putative role of the ACSL4-$cPLA_2$ balance. *Alzheimers Res Ther* 9: 69.

Tokuda H, Kontani M, Kawashima H, Kiso Y, Shibata H, Osumi N. 2014. Differential effect of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on age-related decreases in hippocampal neurogenesis. *Neurosci Res* 88: 58–66.

Tokudome Y, Imaeda N, Ikeda M, Kitagawa I, Fujiwara N, Tokudome S. 1999. Foods contributing to absolute intake and variance in intake of fat, fatty acids, and cholesterol in middle-aged Japanese. *J Epidemiol* 9: 78–90.

USDA nutrient intakes from food: mean amounts consumed per individual, by gender and age. 2012. What we eat in America, NHANES 2009–2010. USDA, Agricultural Research Service.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, *et al.* 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286: 735–741.

Vossel KA, Zhang K, Brodbeck J, *et al.* 2010. Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport. *Science* 330: 198.

Walter S, Letiembre M, Liu Y, *et al.* 2007. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem* 20: 947–956.

Whelan J, Li B, Birdwell C. 1997. Dietary arachidonic acid increases eicosanoid production in the presence of equal amounts of dietary eicosapentaenoic acid. *Adv Exp Med Biol* 400B: 897–904.

Whelan J, Surette ME, Hardardóttir I, *et al.* 1993. Dietary arachidonate enhances tissue arachidonate levels and eicosanoid production in Syrian hamsters. *J Nutr* 123: 2174–2185.

Wielinga PY, Harthoorn LF, Verschuren L, *et al.* 2012. Arachidonic acid/docosahexaenoic acid-supplemented diet in early life reduces body weight gain, plasma lipids, and adiposity in later life in ApoE*3Leiden mice. *Mol Nutr Food Res* 56: 1081–1089.

Youssef I, Florent-Béchard S, Malaplate-Armand C, *et al.* 2008. N-truncated amyloid-beta oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiol Aging* 29: 1319–1333.

Zhao J, Del Bigio MR, Weiler HA. 2011. Maternal arachidonic acid supplementation improves neurodevelopment in young adult offspring from rat dams with and without diabetes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 84: 63–70.

Zhuang P, Shou Q, Lu Y, *et al*. 2017. Arachidonic acid sex-dependently affects obesity through linking gut microbiota-driven inflammation to hypothalamus-adipose-liver axis. *Biochim Biophys Acta* 1863: 2715–2726.

Cite this article as: Pinchaud K, Maguin-Gaté K, Olivier J-L. 2018. Dietary arachidonic acid: a Janus face actor in brain and Alzheimer's disease? *OCL* 25(4): D406.

Chapitre 4 : Première étude, effets d'un apport alimentaire en acide arachidonique dans un contexte modérément hyperlipidique.

"L'important dans la recherche, c'est l'imprévisible."

François Gros et *François Jacob*, Biologistes

I. Introduction

Pour le premier axe de ce travail de thèse, le protocole expérimental utilisé a pour objectif l'étude des effets d'une supplémentation en ARA dans un contexte modérément hyperlipidique sur le microbiote intestinal et plus précisément sur l'axe microbiote-intestin-cerveau. Au travers des différentes modifications engendrées par cet apport alimentaire, nous nous sommes intéressés à l'induction potentielle d'une inflammation chronique de bas grade, mais cela nécessite la prise en compte de l'influence globale du bol alimentaire sur les mécanismes inflammatoires de l'organisme ainsi que sa fenêtre temporelle d'administration pour induire des effets biologiques. Pour évaluer les effets de l'ARA, son apport au sein de l'alimentation sera comparé par une condition contrôle, un régime murin conventionnel qui se caractérise par un apport lipidique de 5% et riche en AL.

Cet axe de travail reste dans la continuité de l'étude antérieure de Thomas et ses collaborateurs sur les effets de différents régimes murins enrichis comprenant 10% de lipides (Thomas *et al*., 2017). Cet apport lipidique de 10%, en comparaison avec les régimes conventionnels, a été privilégié afin de pouvoir manipuler au mieux la composition en lipides afin d'en évaluer les effets. En tant que contrôle positif à une alimentation supplémentée en ARA, un premier régime comportant 44% d'acide oléique et 15% d'AL sur la composition générale des lipides (10%) a été utilisé. Le choix de l'acide oléique, un AG monoinsaturé, a été privilégié aux vues de ses propriétés trophiques précédemment rapportées par la littérature (de Silva *et al*., 2014).

Enfin, la composition lipidique du régime princeps de cette étude comportait 11,5% d'ARA, 20% d'AL et 27 % d'acide oléique sur la composition générale de lipides soit 1g d'ARA pour 100g de nourriture. Ce régime test était donc à la fois riche en AGs ω-6, enrichi en ARA et fut présumé par les auteurs comme étant un facteur de susceptibilité de la MA. En lien avec l'étude précédemment citée, de nouvelles hypothèses ont pu être formulées pour ce travail de thèse, avec comme intention première de caractériser les conséquences de l'ARA sur le microbiote intestinal et sur l'inflammation périphérique et centrale, explication potentielle de son lien avec la MA. L'étude pionnière de Zhuang et ses collaborateurs introduit pour la première fois dans la littérature un régime hyperlipidique (favorisant l'obésité et l'inflammation), soit 45% de l'apport lipidique énergétique (Zhuang *et al.*, 2017) couplé à un enrichissement en ARA (1g pour 100 g de nourriture). Cette approche se révèle innovante grâce à un protocole expérimental basé sur la différenciation entre souris femelles et mâles en réponse à l'administration de ce régime. Les résultats ont démontré une réponse plus délétère chez les

mâles que chez les femelles, ce qui a conditionné le sexe de nos animaux pour l'ensemble de nos expérimentations. Parmi les différents effets du régime hyperlipidique et de l'ARA, les auteurs ont démontré une dysbiose intestinale favorisant l'inflammation, ramenant au premier plan l'importance du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte. Les travaux proposés par l'équipe de Benoit ont également participé à la genèse de ce projet. Ces recherches ont montré qu'un apport lipidique de 20% véhiculé au travers de l'alimentation, dénommé régime « modérément hyperlipidique » par les auteurs, induisaient des modifications physiologiques plus significatives en comparaison avec un régime « hyperlipidique » à 45% de lipides (Benoit *et al.*, 2015). Parmi les conséquences physiologiques induites par ces régimes « hyperlipidiques », on retrouve notamment la modification du microbiote intestinal favorisant l'établissement d'une inflammation.

L'ensemble de ces trois études a donc contribué à la mise en place de notre propre régime supplémenté en ARA et dont les effets pro-inflammatoires seraient potentialisés par un apport lipidique de 15%. Ce régime modérément hyperlipidique supplémenté en ARA, qui sera dénommé tout au long de cette étude sous l'appellation régime « HL+ARA », est composé de 6,6% d'ARA, 25,3% d'AL et 27,4% d'acide oléique sur la composition générale en lipides soit 1g d'ARA, 3,8g d'AL et 4,1g d'acide oléique pour 100g de nourriture. Afin d'être pertinent dans notre protocole expérimental et pouvoir comparer nos résultats avec ceux de la littérature, nous avons décidé d'évaluer les effets de l'ARA sur la composition du microbiote fécal, l'inflammation périphérique et la neuroinflammation (en étudiant l'expression génique des principaux marqueurs inflammatoires) ainsi que sur l'intégrité de la barrière colique et de la BHE.

En ce qui concerne la durée d'administration des régimes alimentaires, la majorité des études rapportées dans la littérature présentent des durées très diverses mais dépassent majoritairement 6 semaines de régime. L'étude précédente de Thomas *et al.*, 2017 n'ayant pas réalisé d'analyse en amont des 12 semaines d'administration, il est possible que l'administration des régimes alimentaires aient déjà induits des effets durant les 9-10 semaines précédentes. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé notre étude sur la même durée de 12 semaines mais en introduisant une étape intermédiaire d'évaluation à 9 semaines afin de caractériser au mieux la cinétique d'action de l'ARA.

Enfin, et pour s'assurer d'une meilleure rigueur expérimentale, nous avons décidé d'introduire un double contrôle à notre régime « HL+ARA ». En effet, nous avons utilisé un régime conventionnel de souris comme contrôle de la quantité de lipides dans le régime, qui sera dénommé « Std-ARA » et un troisième et dernier régime qui se veut un contrôle positif

des effets de l'ARA, sa constitution sera donc sensiblement identique à notre régime test mais un apport en ARA minime (0,9% sur la composition en lipides). Ce régime modérément hyperlipidique sera abrégé sous le terme « HL-ARA ». L'étude de ces différents régimes a donc pour finalité de caractériser au mieux les effets physiologiques de l'ARA sur le microbiote intestinal et sur les processus inflammatoires de l'organisme, deux mécanismes clés qui pourraient nous permettre de mieux comprendre le rôle potentiel de l'ARA dans la MA et ainsi par la suite d'envisager un moyen de prévention alimentaire comme nous en discuterons lors du *Chapitre 5*.

II. Matériels et méthodes

A. Conception et production des régimes alimentaires

Afin de répondre aux objectifs décrits ci-dessus, nous avons choisi de concevoir 3 régimes différents :

- un régime dit « Standard » (« Std-ARA »), normolipidique constitué de 5% de lipides (15% d'énergie issue des lipides) non enrichi en ARA, ce régime étant similaire aux régimes conventionnellement consommés par les souris,
- un régime dit « modérément hyperlipidique » (« HL-ARA ») constitué de 15% de lipides (45% d'énergie issue des lipides), non enrichi en ARA,
- un régime dit « modérément hyperlipidique » (« HL+ARA ») constitué de 15% de lipides (45% d'énergie issue des lipides) enrichi avec 1% d'ARA.

Les deux régimes modérément hyperlipidiques (15% de lipides) ont une composition identique sauf en ce qui concerne l'introduction d'ARA dans le régime « HL+ARA » (prise sur la proportion d'AL), la proportion d'AGs de la série ω-6 étant conservée dans les trois régimes.

Les différents régimes ont été préparés au sein de l'UPAE (Unité de Préparation des Aliments Expérimentaux) de l'INRAE de Jouy-en-Josas sur la base des formulations que nous avons conçues. Ces formules ont été réalisées après analyses des différentes huiles par chromatographie à phase gazeuse au sein du laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBIO) (*Figure 24, p.122*) qui nous a permis de réaliser une composition théorique en AGs des croquettes et de vérifier leur bonne composition après conception. Les analyses ont été effectuées avec étalon interne (C17) en double essai indépendant. L'estérification des échantillons a été réalisée par la méthode « BF3-Methanol » (Ackman, 1998) sur un appareil de chromatographie à phase gazeuse (Shimadzu, GC-2010) équipé d'une colonne capillaire (SP®-2380 Capillary GC Column, L × I.D. 60 m × 0.25 mm, d_f 0.20 µm).

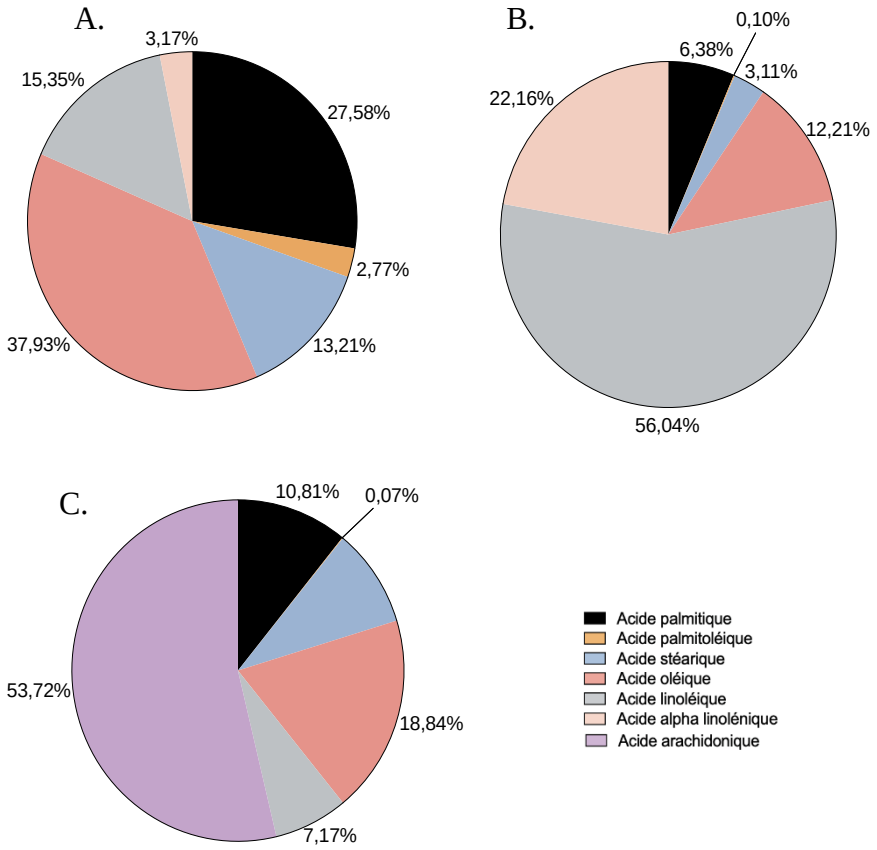


Figure 24 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse de la composition en acide gras des principaux constituants lipidiques des différents régimes.

Les huiles utilisées et le saindoux présentent une composition en acide gras très différentes les unes des autres. (A) La composition du saindoux se caractérise par une très forte présence de l'acide oléique (37,93%) et palmitique (27,58%). (B) L'huile de chanvre est majoritairement composée d'acide linoléique (56,04%). (C) Enfin l'huile Life™ ARA se caractérise principalement par la présence d'acide arachidonique (53,72%), un acide gras qui n'entre pas dans la composition du saindoux et de l'huile de chanvre.

Les formules théoriques (*Tableau 4*) des différents régimes ont ensuite été réalisées à partir de la composition en AGs des huiles végétales et du saindoux avant que les régimes ne soient confectionnés au sein de l'INRAE de Jouy en Josas. L'huile de chanvre provient de l'huilerie d'Ormes (Fermes d'Ormes, Ormes, France) et l'huile Life's ARA™ a gracieusement été fournie par la société DSM (Dutch State Mines). Les autres éléments des régimes ont été fournis par l'UPAE de l'INRAE de Jouy-en-Josas lors de la fabrication des croquettes.

Le régime standard murin « Std-ARA » contient 5% de lipides, apportés via le mélange des différentes huiles, est qui correspond à 15% d'apport lipidiques du régime. À l'inverse, les

régimes « HL-ARA » et « HL+ARA », considérés comme modérément hyperlipidiques sont composés d'une proportion plus élevée en lipides, de l'ordre de 15%, constituant de ce fait 45% de l'apport énergique de ces régimes (*Figure 25, p.124*).

Tableau 4 : Composition des régimes alimentaires en pourcentage.

	Std-ARA	HL-ARA	HL+ARA
Saindoux	3	9	8,5
Huile de chanvre	2	6	4
Huile Life^{TM} ARA	0	0	2,5
Cellulose Durieux	5	5	5
Caséine HCl	14	14	14
L Cystine Labo	0,18	0,18	0,18
Composé minéral AIN93M	3,5	3,5	3,5
Composé vitaminique AIN93Vx	1	1	1
Choline bitartrate	0,25	0,25	0,25
TBHQ	0,0008	0,0008	0,0008
Maltodextrine	15,5	15,5	15,5
Amidon de maïs	45,5692	38,5692	38,5692
Sucre semoule	10	7	7

La composition en AGs des différents régimes a été analysée à la suite de leur production par le fournisseur. Les résultats obtenus ont été conformes avec nos prévisions, ce qui indique que le processus de fabrication des croquettes des souris n'a pas altéré les AGs des composants. Les croquettes ont été conservées hermétiquement à 4°C, à l'abris de la lumière et de l'humidité dans le but de conserver les AGPIs d'une oxydation potentielle.

L'ensemble des régimes alimentaires comportent des compositions sensiblement identiques en AGs saturés, soit en acide palmitique et stéarique (32,93% pour le régime « Std-ARA », 32,89% pour le régime « HL-ARA » et 32,90% pour le régime « HL+ARA ») et insaturés soit des autres acides agras présents sur la *figure 26* (67,07% pour le régime « Std-ARA », 67,11% pour le régime « HL-ARA » et 67,1% pour le régime « HL+ARA ») (*Figure 26, p.125*).

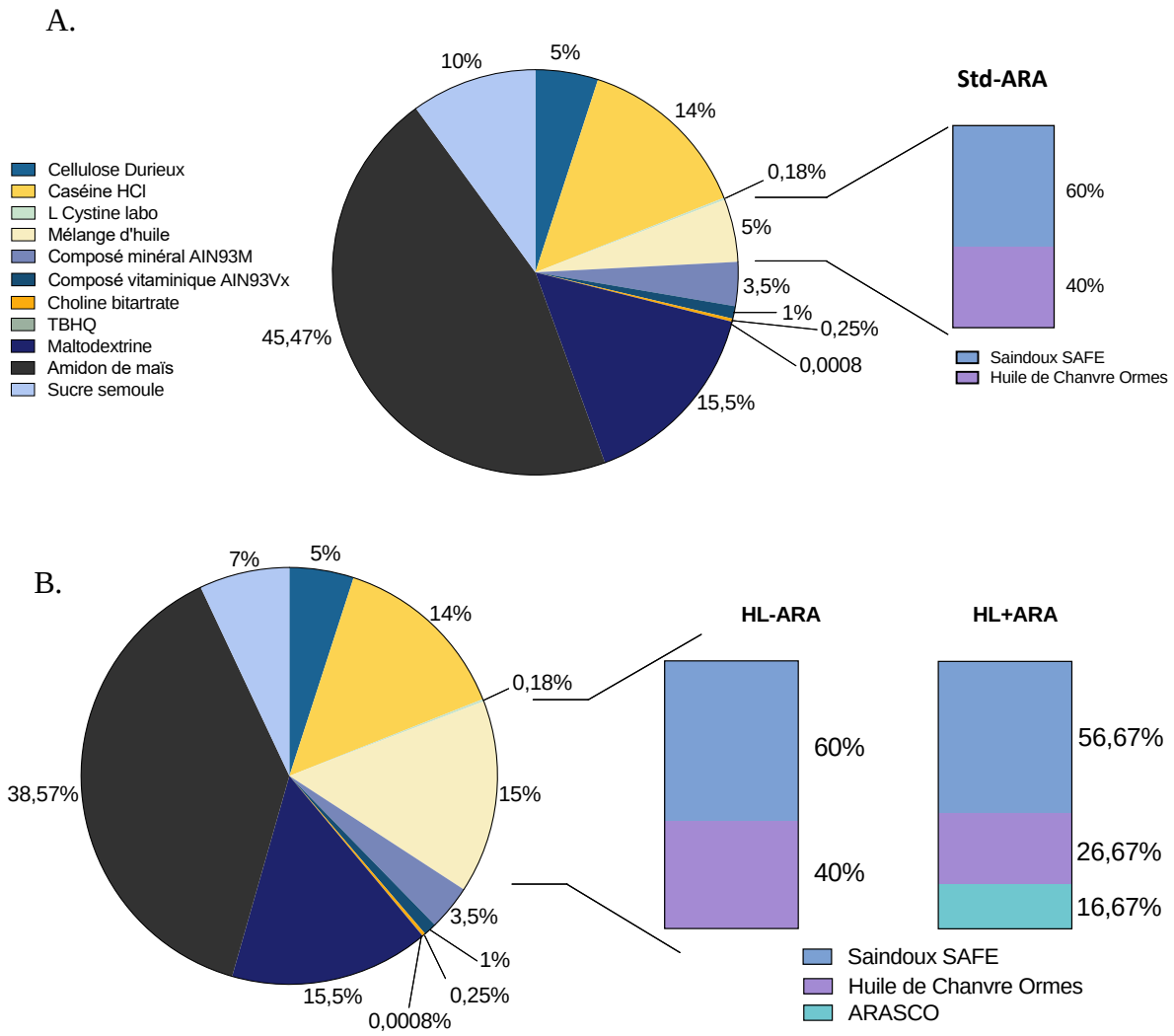


Figure 25 : Composition des différents régimes.

(A) Le régime standard murin « Std-ARA » procure un apport lipidique de 5% apporté par le mélange de Saindoux et d'huile de chanvre. (B) Afin de constituer des régimes modérément hyperlipidiques, cet apport a été triplé pour former le régime « HL-ARA ». Le régime « HL+ARA » est une variante du régime « HL-ARA » comprenant l'ajout de l'huile Life™ ARA (Arasco™) comme apport d'acide arachidonique. Afin de préserver le rapport ω-6/ω-3, la part d'acide arachidonique apportée dans ce régime (à hauteur de 1,1% dans le régime) est soustraite en acide linoléique, le précurseur de l'acide arachidonique.

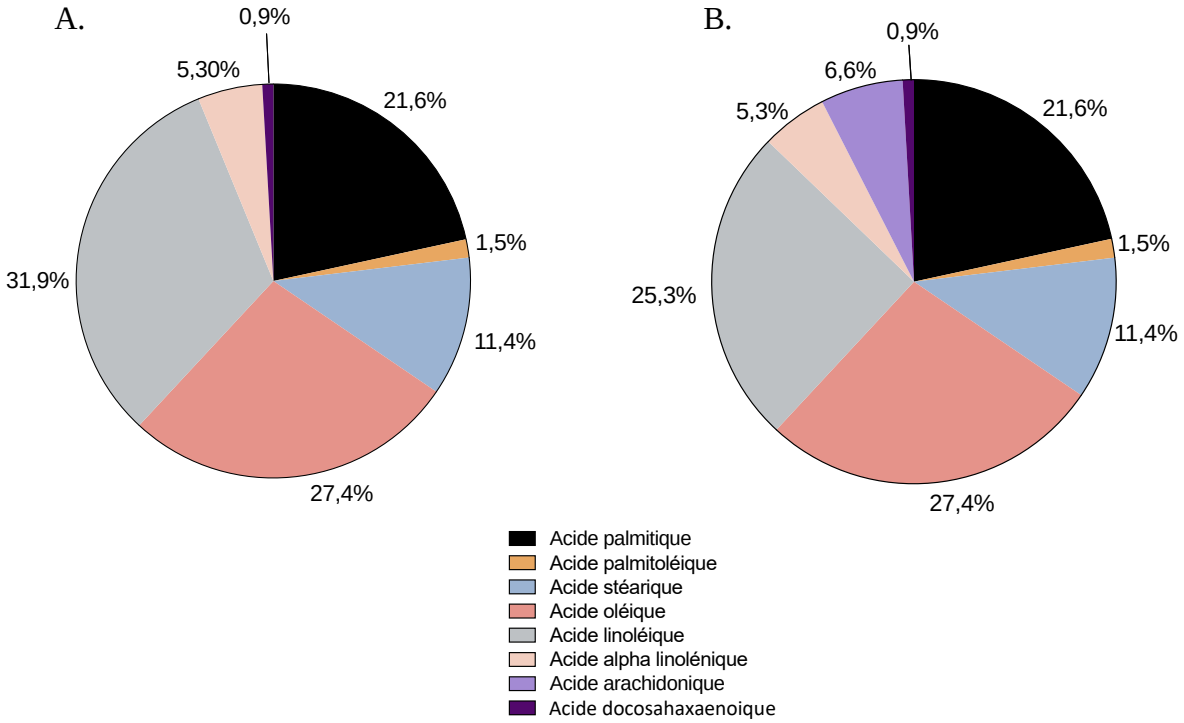


Figure 26 : Composition en acides gras des différents régimes alimentaires.

(A) Les proportions d'acides gras sont identiques entre les régimes « Std-ARA » et « HL-ARA », seule la quantité de lipides diffère entre ces régimes. (B) En comparaison avec les deux autres régimes, le régime « HL+ARA » contient de l'acide arachidonique (6,6% des acides gras).

Le régime « HL+ARA », outre le fait qu'il contient plus de lipides que le régime contrôle « Std-ARA », est un régime enrichi en ARA à hauteur de 6,6% de la part totale d'AGs apportés dans ce régime (contre 0,9% dans les deux autres régimes). Cette part en ARA est remplacée dans les régimes « Std-ARA » et « HL-ARA » par de l'AL. Le régime « HL+ARA » est donc légèrement plus pauvre en AL puisqu'il contient 25,3% contre 31,9% sur la part totale des lipides pour les régimes « Std-ARA » et « HL-ARA ». Le taux d'acide docosatétraénoïque ne diffère pas entre les trois régimes puisqu'il reste à 0,2%. Concernant les ω-3 (comprenant l'ALA et le DHA), les trois régimes comportent des taux équivalents de l'ordre de 6,2%, un taux dépassant les besoins journaliers des souris (Amtul *et al.*, 2012). La part des ω-6 quant à elle (comprenant l'AL, et l'ARA) est de 32,03% pour le régime « Std-ARA » et 32,07% pour les régimes modérément hyperlipidiques. Les taux d'ω-6 et d'ω-3 étant sensiblement similaires, le ratio ω-6/ω-3 est par conséquent équivalent entre les trois régimes (5,16% pour le régime « Std-ARA », 5,17% pour les régimes modérément hyperlipidiques).

B. Méthodologies *in vivo*

1. Animaux et conditions d'hébergement

Les animaux auxquels nous avons eu recours pour cette expérimentation sont des souris mâles BALB/cOlaHsd provenant de la structure ENVIGO (Gannat, France), âgées de 6 semaines à leur réception au laboratoire. Ces animaux ont été hébergés en conditions standards (température 21±2°C, hygrométrie 50±5%) avec un cycle d'éclairage lumière/obscurité de 12h. Les animaux ont été acclimatés pendant 2 semaines après leur arrivée à l'animalerie avant le début de l'expérimentation. A la suite des 2 semaines d'acclimatation, les animaux ont été randomisés au sein de nos trois groupes de régimes (« Std-ARA », « HL-ARA » et « HL+ARA ») et placés dans des cages individuelles transparentes (725 cm² de surface, 15 cm de hauteur) enrichies (tunnel réutilisable - 10 cm de long ; 5cm de diamètre - et matériel de nidification à base de coton). Les souris ont un accès *ad libitum* à l'eau de boisson et à la nourriture.

L'animalerie dans laquelle les animaux ont été hébergés est sous la responsabilité du M. Henri Schroeder et a été agréé par le comité vétérinaire de Meurthe et Moselle (Nancy) sous le numéro d'autorisation D54-547-13. Les procédures d'expérimentation et de traitement ont été réalisées dans le cadre de la réglementation française en vigueur et en conformité avec la Directive Européenne (2010/63/UE) prenant en compte la règle des 3R (réduction, raffinement, remplacement) et le bien-être animal. Ce projet a également été approuvé par le Comité d'Éthique Lorrain en matière de réglementation animale (CELMEA) référencé sous le numéro de dossier APAFIS14324-2018032917508930.

2. Protocole d'expérimentation animale

Lors de cette expérience, nous avons utilisé au total 45 souris BALB/cOlaHsd mâles âgées en début de protocole de 6 semaines. Ces animaux ont été subdivisés en 3 groupes (n=15/groupe) de traitement : le groupe « Std-ARA », le groupe « HL-ARA » et le groupe « HL+ARA ». Notre étude a été une expérience longitudinale sur 12 semaines durant lesquelles, les animaux ont été nourris exclusivement avec le régime correspondant à leur groupe. Les animaux ont été ensuite mis à mort afin de réaliser des études sur la présence de protéines (Western-Blot, ELISA et immunohistochimie), l'expression génique (RT-qPCR) de différentes cibles ainsi que sur la perméabilité de la BHE (*Figure 27, p.127*).

Avant le début de l'expérimentation (semaine 0), des prélèvements sanguins et de fèces (10 animaux/groupe) ont été réalisés afin de servir de contrôle. Les différents régimes ont été ensuite administrés durant 9 semaines sans interruption et de nouveaux prélèvements sanguins et de fèces ont été réalisés. Pour chacun de nos groupes de régime, les animaux ont été à nouveaux randomisé au sein de 2 sous-groupes :

- 5 animaux par groupe de régime ont été mis à mort à l'âge de 17 semaines, soit 9 semaines de régime afin d'observer à l'aide des techniques de Western-Blot, de RT-qPCR, d'ELISA et d'immunohistochimie, la présence d'un état inflammatoire périphérique et central.
- 10 animaux par groupe de régime ont été maintenus en vie jusqu'à l'âge de 20 semaines, soit 12 semaines de régime. Un test de labyrinthe en Y a été réalisé en semaine 11 puis des prélèvements de fèces et sanguins ont été réalisés à la fin des 12 semaines de régime. Leur mise à mort après 12 semaines de régime est réalisée dans le but d'observer des modifications de la perméabilité et de l'intégrité de la BHE.

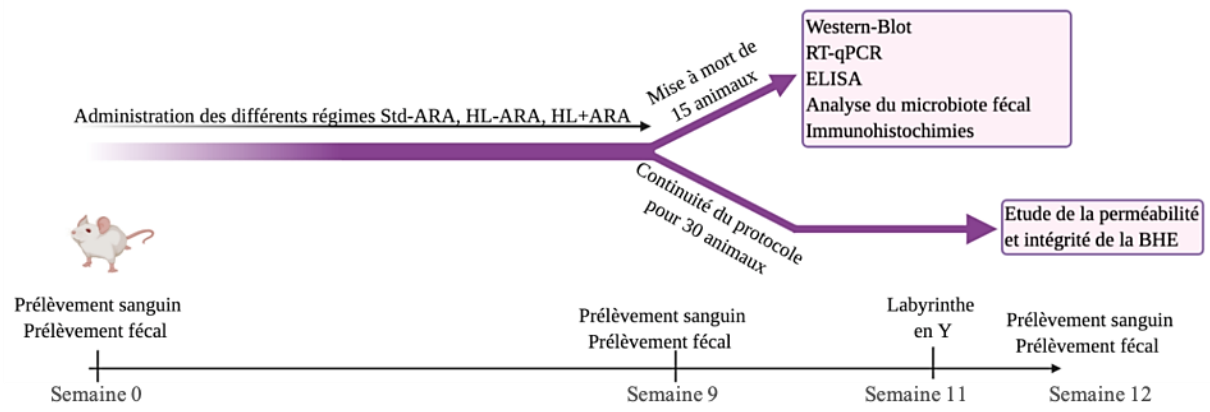


Figure 27 : Protocole expérimental. Figure réalisée avec BioRender.

3. Prise de poids, prise alimentaire et hydrique

Le poids des animaux a été évalué chaque semaine et présenté sous forme de courbe de poids (exprimée en gramme) au travers des 12 semaines de protocole. La consommation hydrique (exprimée en mL) et alimentaire (exprimée en cal) ont également été quantifiées. Les prises alimentaires et hydriques ont été calculées après mesure du poids restant dans la mangeoire ainsi que dans le biberon et en prenant en compte la quantité fournie en début de semaine précédente.

4. Analyses comportementales

Les analyses comportementales ont nécessité des mises au point car les tests employés n'avaient pas été implantés antérieurement chez la souris au sein du laboratoire Calbinotox. Les protocoles présentés dans cette thèse sont ceux établis après mise au point de l'ensemble des procédures expérimentales.

Afin d'assurer la reproductibilité des analyses comportementales, plusieurs protocoles ont été mis en place. Avant chaque analyse comportementale, les animaux ont été isolés dans la salle de comportement afin de les acclimater et ainsi réduire le stress lié à un nouvel environnement, susceptible d'altérer les résultats. Les dispositifs expérimentaux ont été également nettoyés à l'alcool avant et entre chaque évaluation afin d'éviter tout stress olfactif chez la souris. Les différentes expérimentations ont été conduites en double aveugle afin d'éviter tout biais lié à l'expérimentateur. L'analyse du comportement murin a été évaluée grâce à un logiciel d'enregistrement et d'analyse vidéo pour une plus grande robustesse des résultats.

a. Logiciel d'enregistrement et d'analyse du comportement

Toutes les analyses comportementales ont été enregistrées à l'aide d'une caméra couplée à un logiciel de Tracking vidéo nommé Any-Maze (Stoelting, Allemagne) permettant de mettre en évidence la tête de l'animal, son centre de gravité ainsi que sa queue. Ce dispositif permet en plus de l'enregistrement, une mesure semi-automatique de certaines variables comportementales des animaux.

b. Étude de la mémoire à court terme - Le labyrinthe en Y

La mémoire à court terme ou mémoire de travail a été évaluée par le test du labyrinthe en Y qui est basé sur l'attrait des animaux à explorer de nouveaux environnements. Le dispositif est composé de 3 bras en plexiglas noir opaque de 40 cm de long, 5 cm de large et 14 cm de hauteur et orientés à 120° les uns par rapport aux autres. Le sol est en plexiglas transparent, sous lequel sont ajoutées des figures géométriques servant d'indices spatiaux à la souris, lui permettant de s'orienter et de distinguer les différents bras. Les tests se sont déroulés dans une pièce séparée de l'expérimentateur par un rideau opaque et éclairée par une lumière blanche dont l'intensité est mesurée grâce à un luxmètre (environ 10 lux dans chacun des bras).

Les animaux ont été placés dans un des trois bras de façon aléatoire (afin de ne pas induire de préférence pour un des bras), tête vers la paroi de ce même bras puis laissés libres

d'explorer le dispositif durant 5 minutes. Le logiciel de tracking vidéo a été paramétré de sorte qu'une entrée dans un bras soit notifié au moment où les quatre pattes de l'animal franchissent les cinq premiers centimètres du bras (éliminant toute hésitation possible de l'animal). Le nombre d'entrée dans les bras et le nombre d'alternance (soit le nombre successif de visite de chacun des bras du labyrinthe - BCA, ABC, CAB etc…) ont été quantifiés, ce qui a permis de calculer le pourcentage d'alternance selon l'équation suivante :

$$Alternance\ (\%) = \left(\frac{Nombre\ d'alternance}{Nombre\ d'entrée - 2}\right) * 100$$

Ce pourcentage d'alternance spontanée de l'animal entre les différents bras du dispositif est utilisé comme mesure des performances de mémoire à court terme. Une diminution de ce pourcentage entre des groupes traduit une diminution des capacités mnésiques à court terme.

5. Mise à mort des animaux et prélèvement des échantillons

Les prélèvements de sang ont été réalisés au niveau de la veine submandibulaire. Le sang a été collecté dans un tube contenant de l'héparine (5µL/mL de sang) et centrifugé à 2 000 g à température ambiante durant 10 minutes. Le plasma a ainsi été récupéré est conservé à -80°C pour analyse ultérieure. Pour les prélèvements de fèces, les souris ont été déposées dans des cages propres dépourvues de litières puis les fèces ont été récupérées à l'aide d'une pince stérile et placées dans des tubes stériles afin d'éviter toute contamination, puis conservés à -80°C.

A la fin des 9 semaines de protocole, 5 animaux par groupe ont été mis à mort par décapitation pour prélever les structures cérébrales (cervelet, cortex et hippocampes), ainsi que le foie, les tissus adipeux (mésentérique et épididymaire) et le colon. Les organes tels que le colon, foie et tissus adipeux ont été congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C pour analyse de l'expression génique ou de la présence de protéine. Les échantillons de foie et de colon ont ensuite été broyés dans l'azote pour extraire les ARNs et les protéines.

Le cerveau des animaux restant a été séparé en deux au niveau de la scissure interhémisphérique. Un hémisphère a été conservé à -80°C (puis broyé à l'azote) afin de réaliser des études de l'expression génique des cytokines par RT-qPCR, et le second a été congelé dans de l'isopentane refroidi puis conservé à -80°C pour analyse de la présence de protéines par immunohistochimie.

C. Méthodologies *ex vivo*

1. Extraction des acides nucléiques et des protéines de foie et de colon

L'ADN, l'ARN et les protéines présents dans le foie et le colon ont été extraits au moyen du kit AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen, ID : 80004) selon les recommandations du fournisseur (*Figure 28, p.131*). Les échantillons broyés préalablement à l'azote ont été lysés dans le tampon RLT complémenté de β-mercapto-éthanol à l'aide d'un vibro-broyeur RETSCH Mixer Mill MM 200 (Qiagen Retsch GmbH) à température ambiante (20 Hz pendant 2 min) puis déposés sur des colonnes DNeasy (Qiagen, ID : 80004). Les colonnes ont été centrifugés 30 s à 10 000 g. L'éluat contenant les ARNs et les protéines a été additionné d''éthanol 96-100% puis déposé dans une colonne RNeasy (Qiagen, ID: 80004). Une première centrifugation (15 s, 10 000 g) des colonnes à température ambiante a produit d'autres éluats contenant les protéines. Les colonnes RNeasy ont été ensuite lavées et recentrifugées (1 min à 10 000 g) à température ambiante pour récupérer les ARNs totaux dans des volumes de 40 µl d'eau sans RNase. Les colonnes DNeasy sont reprises et lavées deux fois avec le tampon RPE. A la suite de cette série de lavage de la colonne, l'ADN est élué selon les recommandations du fournisseur par centrifugation 1 min à 10 000 g dans 50 µl de tampon EB chauffé au préalable à 70°C. L'ensemble des ARNs, ADNs et protéines obtenues sont conservés à -80°C pour les analyses ultérieures.

Selon les recommandations du fournisseur, les protéines contenues dans l'éluat après passage de l'échantillon dans la colonne RNeasy ont été précipitées à l'éthanol puis centrifugées afin d'obtenir un culot de protéines. Le culot obtenu a par la suite été séché puis re-suspendu dans un tampon RIPA (*radioimmunoprecipitation assay*) (Thermo Scientific™, 89901) supplémenté d'inhibiteur de phosphatases (Sigma-Aldrich, Phosphatase Inhibitor Cocktail 1, P2850) et de protéases (Sigma-Aldrich, cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail, 11836153001). Le volume de tampon RIPA ajouté est à hauteur de 10 fois le poids de matériel utilisé pour réaliser le culot de protéine.

.

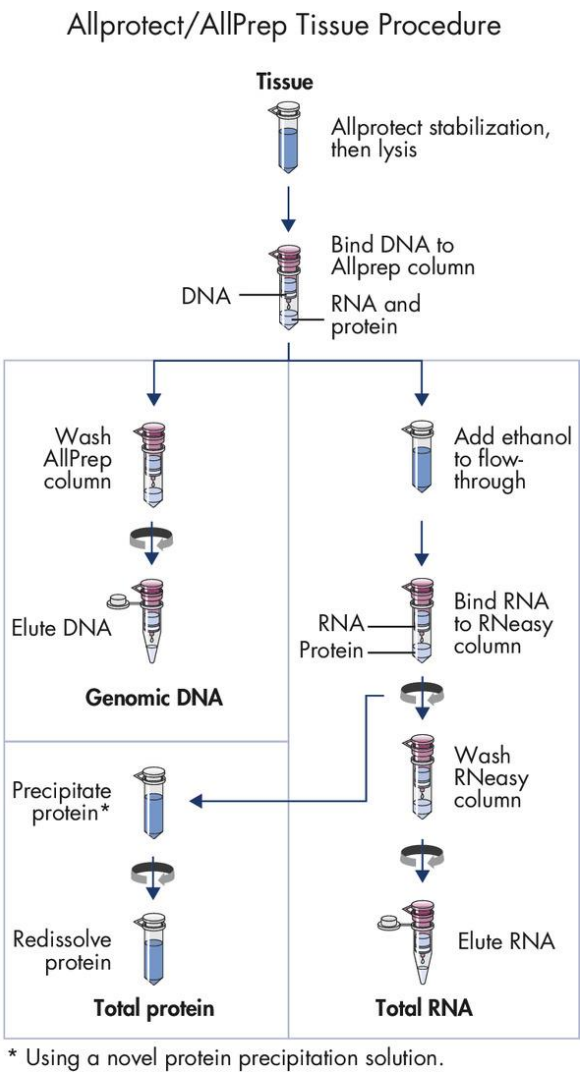


Figure 28 : Schéma de réalisation de l'extraction ADN/ARN/protéines (selon Qiagen).

2. Extraction des ARNs à partir du cerveau et du tissu adipeux

L'extraction d'ARN à partir des tissus gras (cerveau et tissus adipeux) nécessitent un kit d'extraction spécifique, différent de celui utilisé pour les tissus non gras. L'ARN des échantillons a été extrait par l'intermédiaire du RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, ID: 74804) suivant les recommandations du fournisseur. A ce titre, 10 mg de tissu ont été broyés au vibro-broyeur RETSCH Mixer Mill MM 200 (Qiagen Retsch GmbH) à 20Hz pendant 2 min dans le tampon de lyse QIAzol fourni dans le kit. 200 µL de chloroforme ont été ensuite ajoutés à l'homogénat puis l'ensemble a été centrifugé (15 min, 12 000 g à 4°C) afin de séparer les phases. La phase supérieure, aqueuse et incolore renfermant l'ARN a été récupérée et additionnée d'un volume équivalent d'éthanol à 70%. Le mélange phase aqueuse-éthanol a été

ensuite déposé sur une colonne RNeasy puis centrifugé (15 s, 8 000 g à température ambiante). Après une série de deux lavages de la membrane avec le tampon RPE, l'ARN est élué dans 30 µL d'eau sans RNase présente dans le kit du fournisseur. Les ARNs récupérés sont ensuite conservés à -80°C pour analyse ultérieure.

3. Préparation des homogénats de structures cérébrales

Les structures cérébrales prélevées ont été placées dans le même tampon de lyse RIPA supplémenté avec les inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Le volume de tampon utilisé a été ajusté à la taille de la structure cérébrale préparée (500 µL pour le cortex et le cervelet, 200 µL pour les hippocampes). Les tissus ont été dissociés à l'aide d'un mini-potter puis d'une pipette à cône bleu puis à cône jaune. Les échantillons ont été ensuite soumis à 2 cycles de congélation et décongélation puis centrifugés (30 min, 10 000g à 4°C). Les surnageants contenant les protéines ont été récupérés et conservés à -80°C jusqu'à leur dosage par la méthode BCA et analyse par Western blot.

4. Evaluation de l'expression de protéines spécifiques par Western-Blotting

Les concentrations protéiques des échantillons de colon, d'hippocampe ou de cortex ont été quantifiées avec le kit BCA (*BiCinchoninic acid Assay*) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific™, 23227) en suivant les recommandations du fabricant. Le dosage a été réalisé en microplaque par absorbance à 570 nm. Le calcul de la concentration protéique des échantillons a été réalisé à partir d'une gamme d'étalonnage entre 25 et 2 000 µg/mL d'albumine.

Les protéines de colon, d'hippocampe ou de cortex ont été en premier lieu séparées par électrophorèse dénaturante en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) dans un système de migration verticale (BioRad, France). Des gels de 0,75 mm d'épaisseur composés d'un gel de concentration à 5% de polyacrylamide en tampon (0,5M Tris-HCl ; pH 6,8 ; 0,1% (m/v) SDS) sur un gel de séparation 12% de polyacrylamide en tampon (1,5M Tris-HCl ; pH 8,8 ; 0,1% (m/v) SDS) ont été réalisés. Les échantillons ont été dénaturés pendant 5 minutes à 95°C dans du tampon de dénaturation (125mM Tris-HCl, pH 8,0 ; 4% (m/v) SDS ; 10% (v/v) β-mercapto-éthanol ; 0,004% (m/v) bleu de bromophénol) avant d'être déposés dans les puits du gel.

L'électrophorèse a été réalisée dans un tampon de migration (1,5M Tris-HCl, pH 8,3 ; 19,2mM glycine ; 0,01% (m/v) SDS), à 200 V pendant 45 minutes.

Les protéines séparées suivant leur poids moléculaire ont été ensuite transférées sur des membranes de difluorure de polyvinylidène (PVDF) ou de nitrocellulose. Les membranes de PVDF ont été activées dans l'éthanol et celles de nitrocellulose dans de l'eau distillé, puis équilibrées dans le tampon de transfert (48mM Tris-HCl, pH 9,2, 39mM glycine, 1,3mM SDS, 20% (v/v) éthanol). À l'issue de la migration électrophorétique, les gels ont été rincés avec du tampon de transfert avant d'être organisés en sandwich, au contact des membranes entre deux feuilles de papier Whatmann™ imbibées de tampon de transfert. L'ensemble a été disposé dans une cellule de transfert liquide (BioRad), au sein de laquelle les protéines migrent du gel vers la membrane sur la nuit à 12 V.

Après électrotransfert, les membranes ont été immergées dans une solution de blocage (2mM Tris-HCl ; pH 7,4 ; 150mM NaCl ; 0,1% (v/v) Tween-20 ; 5% (m/v) lait écrémé en poudre ou 3% (m/v) de BSA pour *bovine serum albumine*). A la suite de l'étape de saturation, les membranes ont été incubées en présence d'anticorps primaires *mouse IgG anti-GFAP* (1:1000, Sigma-Aldrich, G3893), *goat IgG anti-Iba1* (1:1000, Novus, NB100-1028), *rabbit IgG anti-Claudine-1* (1:2000, Sigma-Aldrich, SAB4503546) ou *mouse IgG anti-β-tubulin* (1:2000, Sigma-Aldrich, T8328), dilués dans la solution de blocage à 4°C et sous agitation sur la nuit. Après 3 lavages de 5 min (2 mM Tris-HCl ; pH 7,4 ; 150 mM NaCl, ; 0,1% (v/v) Tween-20), les membranes ont été incubées en présence d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase : goat *anti-mouse* IgG (1:2500, Novus, AF007), *goat anti-rabbit IgG* (1:5000, Sigma-Aldrich, SAB3700870) ou *donkey anti-goat IgG* (1:2000, Novus, AF109) durant 1h à température ambiante dans le même milieu de blocage. Après lavages, les membranes sont incubées 5 min dans un réactif de révélation ECL puis placées dans un système d'acquisition d'images Chemidoc™ MP imager (BioRad) permettant de numériser l'image et visualiser le signal lié à la protéine d'intérêt. Les analyses densitométriques ont été réalisées grâce au logiciel ImageLab (BioRad), pour une exploitation semi-quantitative des résultats.

5. Mesure des taux de lipocaline-2 et d'interleukine-1β dans le sang, les fèces et le colon par ELISA

Les taux d'IL-1β dans le colon ainsi que la Lcn-2 (dans le sang et les fèces) ont été mesurés à l'aide des kits ELISA Mouse Lipocalin-2/NGAL Quantikine (R&D Systems®,

MLCN20) et Mouse IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet (R&D Systems®, DY401). Ces kits sont basés sur le principe de la méthode immuno-enzymatique ELISA en sandwich.

Le protocole général est le suivant : une première étape de blocage est réalisée à l'aide d'une solution de PBS (*Phosphate-buffered saline*) (pH 7.4, 1X) et de BSA 1%. Les standards de la gamme étalon ou les échantillons sont ensuite déposés dans les plaques avec l'anticorps spécifique à la protéine d'intérêt (Lcn-2 ou IL-1β) conjugué à la biotine puis mis à incuber 2 heures à température ambiante. L'avidine conjuguée à la peroxydase de raifort est ensuite ajoutée dans les puits et incubée. Après addition du substrat Tetramethylbenzidine, seuls les puits contenant la protéine recherchée Lcn-2 ou IL-1β changent de couleur en raison de la réalisation du sandwich anticorps-protéine-anticorps biotinylé. La réaction enzyme-substrat est stoppée par l'addition de l'acide sulfurique et le changement de couleur est mesuré par spectrophotométrie à 450 nm avec une correction à 540 nm afin de s'affranchir des interférences protéiques. La concentration en Lcn-2 (exprimée en pg/g de fèces) ou IL-1β (exprimée en pg/mL d'homogénat de colon) est déterminée en comparant la valeur de densité optique des échantillons après correction à la courbe des standards.

6. Etude de l'expression colique de protéines impliquées dans l'inflammation par la technique d'hybridation sur filtre (protéome profiler)

Le protéome profiler Mouse XL cytokine Array (R&D Systems®, ARY028) est utilisé dans le but de discriminer des marqueurs d'intérêt parmi 140 cibles. Cette technique repose sur une réaction d'anticorps en « sandwich » (comme précédemment) sur membranes de nitrocellulose pré-coatées (*Figure 29*).

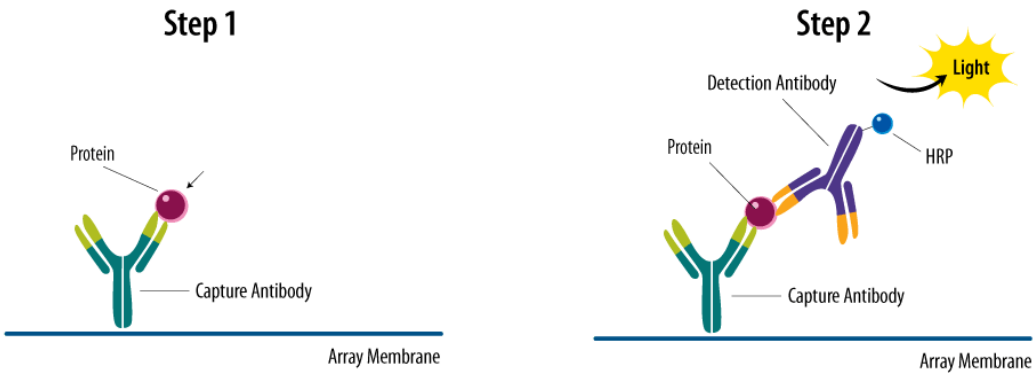


Figure 29 : Principe de réaction d'anticorps en "sandwich".

Un anticorps de capture est disposé sur la membrane (fixé via sa partie Fc). L'échantillon est ensuite ajouté sur la membrane, l'antigène d'intérêt va être reconnu par l'anticorps de capture via sa région Fab. Le complexe anticorps-antigène est ensuite reconnu par un anticorps de détection biotinylé. La révélation s'effectue via l'ajout d'un révélateur chémiluminescent qui permet de produire un signal lumineux proportionnel à la quantité de complexes anticorps-antigène-anticorps formés. Schéma de R&D Systems®.

A partir d'échantillons de colon broyés à l'azote, 10-15 mg de tissus ont été re-broyés dans une solution de PBS et de Triton (1X) additionné d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (1% chacun) à l'aide du vibro-broyeur RETSCH Mixer Mill MM 200 (Qiagen Retsch GmbH) (20 Hz, 2 min). Les échantillons ont été conservés à -80°C avant d'être décongelés et centrifugés à 4°C (5 min, 10 000 g). Les surnageants ont été récupérés, dosés par l'intermédiaire du kit BCA et une quantité égale de protéine a été prélevée dans chaque échantillon (n=3) afin de constituer un *pool* d'échantillon de colon, conservé ensuite dans la glace avant analyse. La membrane de nitrocellulose a été incubée dans le tampon fourni dans le kit (tampon 6 de R&D Systems®), 1 heure à température ambiante sous agitation. Les échantillons ont été ensuite déposés sur les membranes et incubés toute la nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, à la suite de trois lavages consécutifs dans la solution de lavage fournie par le fournisseur, un cocktail d'anticorps de détection reconstitué dans le tampon inclus dans le kit (mélange de tampon 4 et 6 de R&D Systems®) a été ajouté sur la membrane et l'ensemble a été incubé pendant 1 heure à température ambiante, sous agitation et à l'abri de la lumière. Après avoir été lavée de nouveau trois fois avec la solution de lavage, la membrane de chaque groupe expérimental a été incubée pendant 30 min à température ambiante sous agitation à l'abri de la lumière, puis a été lavée de nouveau avant d'être révélée grâce à un mélange d'ECL (électrochimiluminescence) dans un Chemidoc™ MP imager (BioRad).

7. Etude de l'expression cérébrale de la GFAP par immunohistochimie sur coupe tissulaire

Des coupes coronales d'hémisphères de souris (12µm) ont été fixées dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 15 min, puis lavées trois fois avec une solution PBS (pH 7.4, 1X) pendant 5 min. Les coupes ont été perméabilisées 10 min dans une solution de triton 0,1% en PBS et incubées 1 heure à température ambiante avec un tampon de blocage contenant de la BSA 10% et du triton 0,1% dans du PBS. Les coupes ont ensuite été incubées en présence d'anticorps primaires *mouse IgG anti-GFAP* (1:800, Sigma-Aldrich, G3893) dilués dans la solution de blocage sur la nuit à 4 °C avec agitation. À la fin de l'incubation primaire, les coupes ont été lavées avec du PBS pendant 5 min et incubées avec les anticorps secondaires *Goat anti-Mouse* IgG AlexaFluor 488 (1:1000, Invitrogen, A32723) dilués dans la solution de blocage pendant 2h à température ambiante. Le montage entre lame et lamelle a été effectué dans le

milieu de montage Invitrogen™ *ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI* (4',6-diamidino-2-phenylindole) afin de colorer les noyaux cellulaires.

Les demi-cerveaux ont été observés par microscopie à fluorescence à l'aide d'un microscope Nikon (Nikon, Nikon Instruments Europe B.V.). Le logiciel NIS Element (Nikon) a été utilisé pour capturer des photographies (n=2 animaux par groupe et 2 images par zone). Des images du cortex cingulaire (localisation : bregma + 1,42 à −0,22 mm) et de l'hippocampe (localisation : bregma + 1,34 à + 2,06 mm) ont été prises en double aveugle afin de s'affranchir d'une influence des résultats par l'expérimentateur. La localisation des structures prises en photos n'est pas équivalente suivant les images car cette dernière est dépendante de la qualité du tissu ainsi que du marquage.

8. Quantification de l'expression génique au travers de RT-qPCR

Les ARNs totaux ont été extraits comme décrits précédemment en utilisant les kit AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen, ID: 80004) pour le côlon et le foie et RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, ID: 74804) pour les tissus adipeux et cérébraux.

Les ADNs complémentaires ont été synthétisés à l'aide du kit PrimeScript™ RT Master Mix (Takara Bio Inc., Japon) selon le protocole du fabricant à raison de 500 ng d'ARN pour réaliser les réverse-transcriptions (RT) d'échantillons de colon et de cerveau et de 1µg d'ARN pour les échantillons de tissus adipeux et de foie (quantité d'ARN choisie en fonction des concentrations obtenues après extraction). Des PCRs en temps réel ont été préparées avec le réactif TB Green® Premix Ex-Taq™ (Tli RNase H Plus) (Takara Bio Inc., Japon) à partir d'une dilution au cinquième des échantillons obtenus après RT et réalisées en duplicats sur l'appareil BIORAD CFX EN TEMPS RÉEL PCR (Bio-rad Laboratories, États-Unis). Les amorces utilisées pour l'analyse RT-qPCR sont présentées dans le *tableau 5* ci-dessous, la GAPDH étant utilisée comme référence pour l'ensemble des analyses. La gamme d'efficacité et la quantification relative ont été réalisées selon la méthode de Pfaffl (Pfaffl, 2001) suivant le protocole suivant : une gamme d'efficacité de l'amorce a été réalisée à partir d'un échantillon biologique de cette expérimentation (suivant les tissus : sur du colon, du foie, du tissu adipeux ou du cerveau) par l'intermédiaire de dilution en cascade successive de 10 en 10 jusqu'à atteindre 1/100 000ème, soit cinq points de gamme. Les Ct (*Cycle Threshold* ou cycle de seuil) obtenus sont exprimés en fonction de ces points de gamme en échelle logarithmique de façon à réaliser une droite dont la pente permet de déterminer l'efficacité de l'amorce choisie.

L'efficacité de l'amorce est calculée suivant la formule ci-dessous avec une efficacité de 2 étant égale à 100% (puisqu'à chaque cycle, l'ADN complémentaire étant multiplié par deux) :

$$Efficacité\ de\ l'amorce\ (E) = 10^{\left(\frac{-1}{pente}\right)}$$

La méthode de Pfaffl repose sur une normalisation de l'ensemble des résultats en fonction de l'efficacité de chaque amorce réalisée dans chaque type de tissus. La formule de la méthode de Pfaffl permettant de déterminer une expression relative (Exp rela) d'une cible particulière est donc la suivante :

$$Exp\ rela\ cible = \frac{(E\ cible)^{moyenne\ Ct\ cible\ (Std-ARA) - moyenne\ Ct\ cible\ (groupe\ test)}}{(E\ GAPDH)^{moyenne\ Ct\ GAPDH\ (Std-ARA) - moyenne\ Ct\ GAPDH\ (groupe\ test)}}$$

Tableau 5 : Récapitulatif des amorces de RT-qPCR.

Gene		Sequence (5' - 3')	Température
GAPDH	Forward	AATTCAACGGCACAGTCAAGGC	57°C
	Reverse	CGTGGTTCACACCCATCACAAA	
IL-1β	Forward	AGGCCACAGGTATTTTGTCGT	58°C
	Reverse	TGTCCAGATGAGAGCATCCAG	
IL-6	Forward	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	59°C
	Reverse	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	
TNF-α	Forward	AGCCCACGTCGTAGCAAAC	59°C
	Reverse	GATAGCAAATCGGCTGACGG	
IL-12	Forward	ACCTGTGACACGCCTGAAG	57°C
	Reverse	CTCAGAGTCTCGCCTCCTTTG	
IL-10	Forward	ACTACCAAAGCCACAAGGCA	57°C
	Reverse	TGGCAACCCAAGTAACCCTTA	
CD40	Forward	TTGTTGACAGCGGTCCATCT	57°C
	Reverse	TCACGACAGGAATGACCAGC	
Reg-3γ	Forward	TTTCTCAGGTGCAAGGTGAAGT	59°C
	Reverse	ATAGCCCAGTGTCGGGTCAT	
ICAM1	Forward	CATCACCGTGTATTCGTTTCCG	57°C
	Reverse	TACTTGGCTCCCTCCCGAGA	
Claudine 1	Forward	GCCATCTACGAGGGACTGTG	57°C
	Reverse	CACTAATGTCGCCAGACCTGAA	
Occludine	Forward	TGAATGGGTCACCGAGGGAG	57°C
	Reverse	AGAYAAGCGAACCYGCCGA	

9. Analyse du microbiote fécal par séquençage de l'ARN 16S

Afin de réaliser cette analyse, les fèces de 7 animaux par groupe expérimental ont été prélevées en début de protocole (S0) et ceux de 10 animaux par groupe ont été récoltées après 9 semaines de régime. Les animaux ayant été prélevés ont été sélectionnés aléatoirement.

a. Extraction de l'ADNg de fèces

La méthode utilisée afin d'extraire l'ADN génomique de fèces se réfère à celle utilisée dans l'article Godon et collaborateurs (Godon *et al.*, 1997). Lors de cette manipulation, 250 µL d'une solution de guanidine isoThiocyanate (Sigma-Aldrich, G9277) et 40 µL N-Laurosylsarcosine 10% (Sigma-Aldrich, L9150) sont ajoutés aux selles congelées puis l'ensemble est laissé 10 min à température ambiante pour décongélation. Par la suite, 500 µL de N-Laurosylsarcosine-5%, préparé dans du tampon Phosphate (pH8, 0.1M) sont ajoutés dans les tubes avant dissolution complète des fèces puis incubés 1 heure à 70°C dans un bain à sec sous agitation (900 rpm).

Le mélange incubé est transféré dans des tubes contenant 500 mg de billes puis broyés à 4°C au broyeur à billes (Precellys® Evolution, Ozyme) couplé à une unité de refroidissement à l'azote permettant de conserver les échantillons à 4°C (Cryolys® Evolution, Ozyme) suivant le cycle suivant : Agitation (25 Hz, 10 min), repos (5 min), agitation (25 Hz, 3 min). Après le broyage, 15 mg de PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone ; Supelco®, 77627) sont ajoutés aux échantillons puis les tubes sont centrifugés à 4°C (5 min, 20 000 g) afin de récupérer le surnageant. Le culot restant se voit ajouter 500 µL de solution TENP (composée de Tris-Cl, EDTA 0,5 M, NaCl et de PVPP 1%) puis est centrifugé à 4°C (5 min, 20 000 g). Le surnageant ainsi obtenu est groupé avec le premier puis la même opération de lavage est renouvelée jusqu'à obtenir un total de 3 surnageants regroupés en un seul tube. Un volume de 1 mL d'isopropanol (Sigma-Aldrich, I9516) est ajouté au surnageant (10 min à température ambiante) avant d'être centrifugé (10 min, 20 000 g). Le culot ainsi obtenu est re-suspendu dans 450 µL de PBS et 50 µL d'acétate de potassium (Sigma-Aldrich, P1190) puis incubé sur la nuit à 4°C.

A la suite de l'incubation, les tubes sont centrifugés à 4°C (30 min, 20 000 g) puis le surnageant contenant l'ADNg purifié est récupéré. Un volume de 2 µL de RNase A (Sigma-Aldrich, 10109142001) est ajouté avant incubation à 37°C (30 min, agitation 900 rpm). 50 µL d'acétate de sodium (3 M) et 1 mL d'éthanol absolu sont ensuite ajoutés avant une nouvelle étape de centrifugation à 4°C (10 min, 20 000 g) et récupération du culot contenant l'ADN. Après une série de 3 lavages à l'éthanol (70%), le culot est séché à température ambiante durant 2 heures sous sorbonne. Le culot séché est enfin repris dans 20 µL de TE (composé de Tris-Cl et d'EDTA 0,5M) puis incubé sur la nuit à 4°C avant d'être conservé à -20°C pour analyse ultérieure.

b. Séquençage de l'ARN 16S (réalisé par l'unité Micalis au sein de l'INRAE de Jouy-en-Josas)

La région hyper-variable V3-V4 du gène ARNr 16S a été amplifiée en utilisant les amorces suivantes :

- amorce forward :
  « CTTTCCCTACACCGCTCTCTCCGATCTACGGRAGGCWGCAG »,
- amorce reverse :
  « GGAGTTCAGAGTGTTTTTTTTTGATCTTACCAGGGTATTAATCCT ».

Les réactions de PCR réalisées par Mme Sead Chadi, assistante ingénieur au sein de l'unité Micalis de l'INRAE de Jouy-en-Josas, ont été effectuées en utilisant 10 ng d'ADN fécal, 0,5 µM d'amorce, 200 µM dNTP et 0,5 U du Taq-polymése sans ADN (MolTaq 16S POLYmerase d'ADN, Molzym).

Les amplifications sont lancées à 94°C pendant 60 sec, suivies de 30 cycles de variations de températures (94°C pendant 60 sec, 65°C pendant 60 sec puis 72°C pendant 60 sec). L'amplification de l'ADN est suivie par une étape d'élongation terminale à 72°C pendant 10 minutes. Les produits PCR qui en résultent ont été purifiés, quantifiés et envoyés à la plateforme @BRIDGe (INRAE, Jouy-en-Josas) pour séquençage à l'aide de la technologie Illumina MiSeq (Illumina, CA, Etats-Unis).

c. Génération de table OTU et analyse statistique

Cette étape a été réalisée par Mme Sandrine Auger, chercheuse au sein de l'équipe Micalis de l'INRAE de Jouy-en-Josas. Les séquences des amplicons V3-V4 ont été traitées à l'aide du pipeline FROGS (pour *Find Rapidly OTU with Galaxy Solution*) pour obtenir des tableaux d'abondance des unités taxonomiques opérationnelles (OTU) et de leur affiliation taxonomique. Les étapes successives ont impliqué le « *dé-noising* » et le « *clustering* » des séquences en OTUs utilisant SWARM (ablation des chimères à l'aide de VSEARCH) et l'affiliation taxonomique pour chaque OTU en utilisant RDP Classifier sur la base de données SILVA SSU Pintail100 138. Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel « R » (v.4.0.3). Des analyses de l'α et de la β diversité ont été effectuées à l'aide du paquet phyloseq (v.1.34.0) (McMurdie & Holmes, 2013). Pour chaque échantillon, les espèces observées et l'indice Chao1 ont été employés pour estimer la richesse des espèces, tandis que Shannon et InvSimpson ont été utilisés comme indicateurs complets de la diversité et de l'uniformité des espèces. Pour le calcul de la β diversité, les différences entre les communautés microbiennes des échantillons ont été calculées à l'aide de l'indice Bray-Curtis et de l'indice

unifrac pondéré, ce dernier indice incluant des informations phylogénétiques dans l'analyse. Les différences dans les communautés microbiennes entre les groupes ont été évaluées à partir de la distance Bray-Curtis à l'aide de l'analyse principale des coordonnées. Afin d'évaluer les effets du temps et de l'alimentation sur la composition de la communauté bactérienne, une analyse multivariée permutationnelle de la variance (PERMANOVA) sur la matrice de distance Bray-Curtis a été mise en œuvre à l'aide de la fonction « adonis » dans le paquet végétalien R (v.2.5-7). En premier lieu, l'effet du temps sur la composition du microbiote a été évalué. Ensuite, nous avons utilisé le même test pour évaluer l'impact de l'alimentation. Dans les deux approches, le R2 calculé reflète donc la proportion de variance expliquée par le facteur donné dans le groupe d'échantillons testés. Enfin, dans le but de rechercher un OTU différentiellement abondant parmi les différents groupes, DESeq2 (v.1.30.0) a été effectué en réalisant le test d'importance Wald avec une correction du taux de fausse découverte Benjamini-Hochberg. La significativité statistique a été fixée à PAdj < 0,05.

10. Mesure de la perméabilité de la BHE par la fluorescéine de sodium

L'évaluation de la perméabilité de la BHE est basée sur la mesure du passage d'un fluorochrome, la fluorescéine de sodium (NaFu) du compartiment périphérique (sang) au central (tissu cérébral). Pour ce faire, les animaux ont été anesthésiés à l'aide d'un mélange de Zolétil/Xylazine (70 $mg.kg^{-1}$/10 $mg.kg^{-1}$) puis 100 µL de NaFu 10% ont été injectés en intrapéritonéal à chaque souris. Un temps d'attente de 30 min a été laissé afin que le NaFu progresse dans le système cardiovasculaire, puis une thoracotomie suivie d'une ponction cardiaque ont permis de récupérer le sang sur tube sec et de préparer le sérum. Une perfusion intracardiaque de PBS a été réalisée afin de laver le réseau vasculaire cérébral du NaFu et les cerveaux ont été prélevés afin de préparer des homogénats dans du PBS. Les échantillons de sérum et de cerveau ont été conservés à -80°C à l'abri de l'obscurité jusqu'au dosage de la fluorescence (longueur d'onde d'excitation 490 nm et longueur d'onde de fluorescence 515 nm). Celui-ci a été réalisé sur un lecteur de microplaques multimode VICTOR® Nivo™ (PerkinElmer®). La concentration de NaFu dans les échantillons biologiques a été déterminée à l'aide d'une gamme étalon de NaFu. Le ratio de la concentration de NaFu du sérum sur celle du cerveau permet de mettre en évidence la perméabilité de la BHE.

11. Analyses statistiques

Les analyses statistiques permettant l'interprétation des résultats des différentes études réalisées au cours de cette thèse ont été réalisées avec le logiciel GraphPad (GraphPad Software Inc.). La significativité est accordée dès lors que le risque d'erreur p-value est égal ou inférieur à 5%. La normalité de l'ensemble des données a été soumis à vérification grâce au test de Kolmogorov-Smirnov. Les données qui suivent la loi normale ont été analysées par l'intermédiaires de tests paramétriques (test de Student pour les analyses entre deux groupes et ANOVA pour la comparaison de plus de deux groupes, avec analyse post-hoc de Tukey afin d'évaluer les comparaisons inter-groupe) et les données sont représentées sous forme de moyenne ± SEM (erreur standard à la moyenne) pour chaque analyse. A des fins de clarté, les différences entre groupe de régime sont représentées par le symbole « * » et les différences entre la semaine 9 (S9) et semaine 12 (S12) pour un même groupe sont représentées par le symbole « # ».

III. Résultats

A. Les régimes alimentaires modérément hyperlipidiques, avec ou sans acide arachidonique, n'altèrent pas le poids des animaux et les capacités cognitives

Le suivi du poids des animaux (*Figure 30A, p.142*) est identique entre les trois régimes sur l'ensemble du protocole et ne présente pas de différence statistique au travers des différentes semaines d'expérimentations. En ce qui concerne la consommation alimentaire et hydrique, aucune différence significative n'a été remarquée entre les différents groupes (*Figures 30B et 30C, p.142*).

Les capacités cognitives des animaux ont été mesurées par l'intermédiaire d'un labyrinthe en Y en semaine 11 du protocole expérimental. Le nombre d'entrées et le pourcentage d'alternance ont été comptabilisés dans le but de rendre compte respectivement de la mobilité des animaux et de leurs capacités de mémoire à court terme. Dans le cadre de notre étude, le nombre d'entrées dans les branches du labyrinthe reste le même entre les groupes, traduisant une absence d'altération de la motricité chez nos animaux (*Figure 31A, p.142*). Par la même occasion, aucune différence significative n'a été remarquée en ce qui concerne le pourcentage d'alternance entre les groupes. Le régime alimentaire quel qu'il soit n'induit pas d'altération des capacités de mémoire à court terme (*Figure 31B, p.142*).

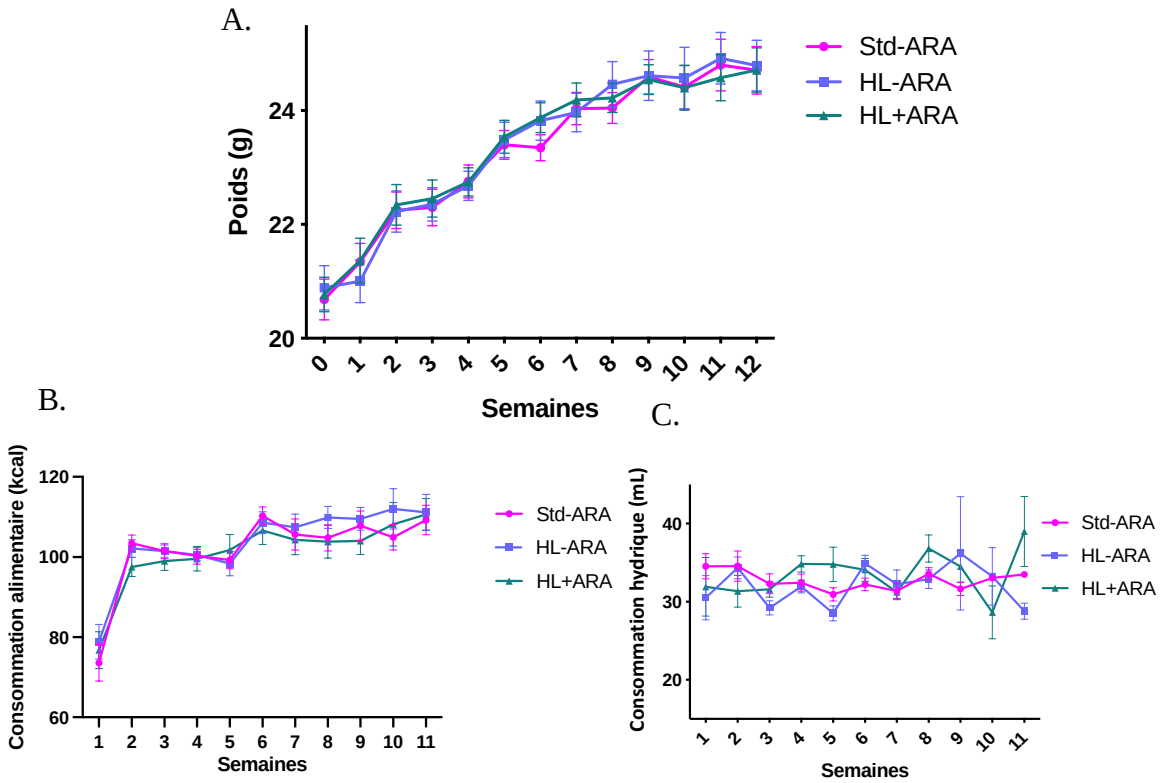


Figure 30 : Effet des différents régimes sur le poids (A), la consommation alimentaire (B) et la consommation hydrique des animaux (C).

N=45 de la semaine 0 à la semaine 9 (n=15 animaux par groupe) et N=27 entre la semaine 9 et la semaine 12 (n=8-10 animaux par groupe). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM.

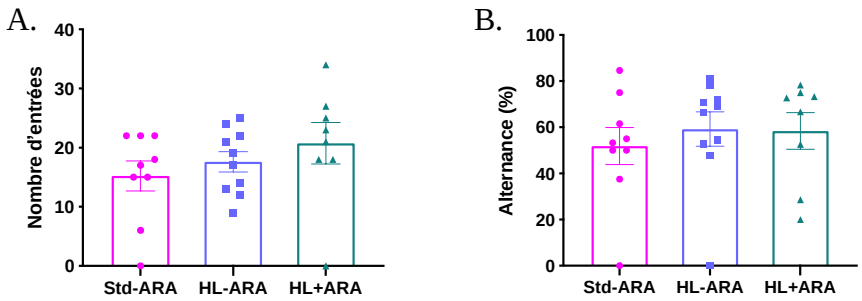


Figure 31 : Évaluation du comportement : étude de mobilité et de mémoire à court terme dans le labyrinthe en Y.

(A) la mobilité au travers du nombre d'entrées dans les branches du labyrinthe et (B) l'alternance (en pourcentage) dans le dispositif expérimental demeurent significativement équivalents entre les différents groupes de régime. N=30 (n=8-10 animaux par groupes). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM.

B. Analyse du microbiote fécal

1. Diversité α et β du microbiote fécal

Dans le cadre de cette étude qui a été mené selon un protocole en deux branches (cf. *Figure 32, p.144*), les fèces des animaux nourris durant 9 semaines ont été prélevées dans le but de réaliser une analyse 16S du microbiote fécal. L'analyse a porté en priorité sur l'évolution entre le début du protocole (S0) et 9 semaines de régime. Les prélèvements de feces à S0 ont été pratiqués sur 2-3 souris par groupe afin de créer un unique groupe S0 de 7 animaux, tandis que ceux à S9 l'ont été sur dix animaux de chaque groupe de régime (« Std-ARA », « HL-ARA », « HL+ARA »).

Les résultats sur l'α et la β diversité révèlent une diminution significative (p-value<0,0001) entre le début de protocole et après 9 semaines de régime. En ce qui concerne l'α diversité, 4 index ont été calculés permettant de déterminer la diversité aux sein des différents groupes de régime : l'index « Observed », « Chao1 », « Shannon » et « InvSimpson ».

Ces index représentent respectivement :

- la diversité observée dans nos différents groupes de régime en début de protocole (« Observed »), et après 9 semaines de régime,
- une estimation/approximation du nombre total d'espèce en prenant en compte les espèces rares n'ayant pu être observées au travers de l'analyse « Observed » (« Chao1 »),
- la jonction entre richesse et diversité (« Shannon ») puisqu'il mesure à la fois le nombre d'espèces et l'inégalité entre les abondances des espèces. Une grande valeur est donnée par la présence de nombreuses espèces avec des abondances bien équilibrées. Les valeurs peuvent aller de un (dans le cas d'une seule espèce dominante) au nombre total de toutes les espèces (dans le cas de toutes les espèces ayant une abondance égale),
- et enfin, l'index « InvSimpson » reflète la probabilité inverse que deux séquences échantillonnées au hasard proviennent de la même espèce.

Au travers de cette étude, nous avons constaté des différences à la baisse, de l'α diversité, qui mesure la richesse taxonomique des communautés microbiennes, entre les microbiotes obtenus à la semaine 0 et ceux à la semaine 9 quelque soit le régime alimentaire (*Figure 32A, p.144*). L'analyse de la β diversité, qui mesure le degré de similitude entre les communautés microbiennes fécales, a montré également cette séparation entre les prélèvements

à la semaine 0 et ceux à la semaine 9 quelque soit le régime alimentaire (*Figure 32B*). En conclusion, les analyses des diversités α et β ont montré une évolution des microbiotes fécaux entre la semaine 0 et la semaine 9 du protocole avec un amoindrissement de la richesse taxonomique quelque soit le régime alimentaire.

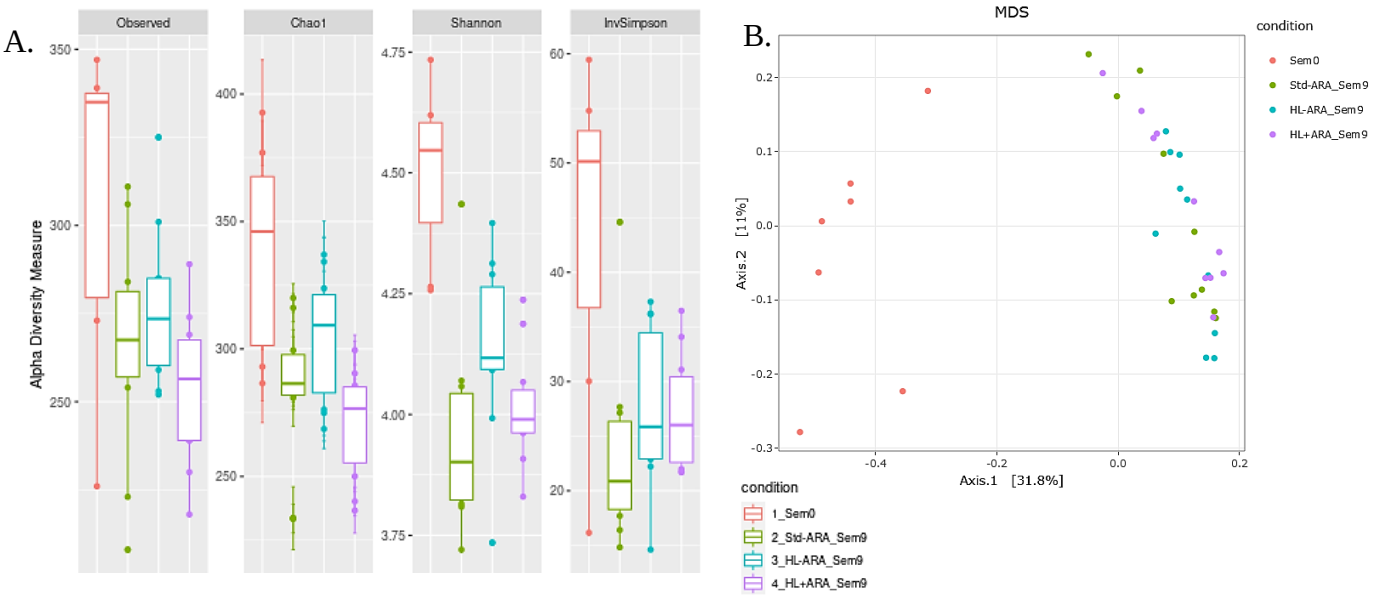


Figure 32 : Représentation de l'alpha (A) et beta (B) diversité du microbiote fécal en fonction des différents régimes.

Pour S0, N=7 ; Pour S9, N= 30 (n=10 animaux par groupe). Graphique réalisé par Mme S. Auger unité MICALIS de l'INRAE de Jouy-en-Josas.

2. Analyse de l'abondance des phyla, genres et espèces

L'abondance des différents phyla a ensuite été analysée dans les prélèvements fécaux des 7 animaux contrôles à S0 avant l'administration des différents régimes et à S9 sur 10 animaux dans chaque groupe de régime. La *figure 33* (*p.145*) reprend la classification et la nomenclature des espèces à partir d'un exemple afin de mieux comprendre l'ensemble des résultats.

Les différents phyla observés dans le microbiote fécal sont regroupés dans la *figure 34* (*p.145*). Les phyla *Bacteroidota* et *Firmicutes* sont les phyla prédominants parmi l'ensemble des phyla représentés (*Actinobacteria, Bacteroidetes, Deferribacteres, Firmicutes, Proteobacteria et Tenericutes*) et identifiés dans le microbiote fécal initial de nos souris, comme cela est habituellement trouvé chez la souris (Park & Im, 2020).

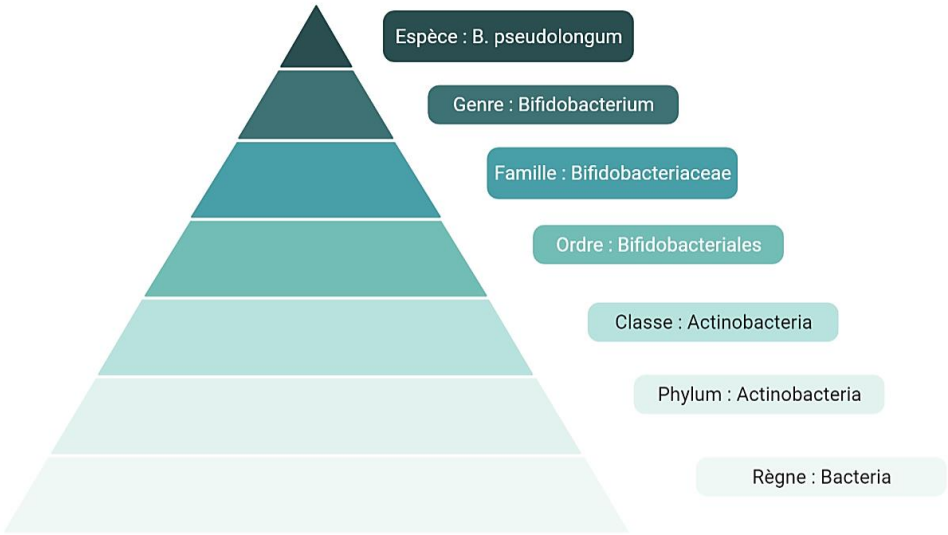


Figure 33 : Classification et nomenclature des bactéries au travers d'un exemple.

Les bactéries sont classifiées en fonction de leur phylum, de leur classe, ordre, famille, genre et espèce. Le bas de la pyramide représente la nomenclature la moins spécifique, ici Bacteria, et le haut de la pyramide correspond à la nomenclature la plus spécifique, ici Bifidobacterium pseudolongum qui sera retrouvé dans les résultats du microbiote fécal. Figure réalisée par BioRender.

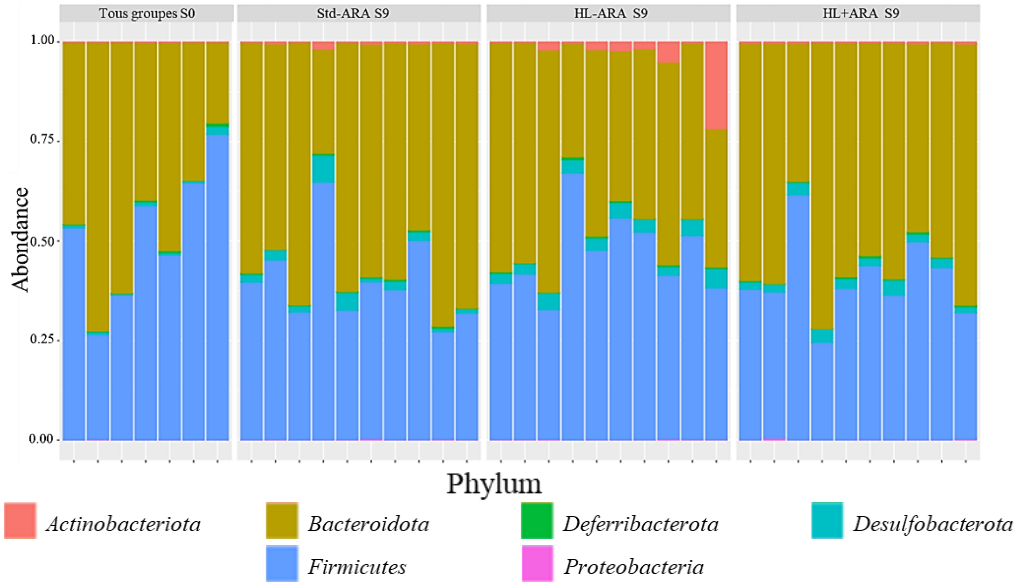


Figure 34 : Composition du microbiote fécal chez les animaux en début de protocole (S0) et après 9 semaines de régime.

Pour S0, N=7 ; Pour S9, N= 30 (n=10 animaux par groupe). Graphique réalisé par Mme S. Auger unité MICALIS de l'INRAE de Jouy-en-Josas.

En ce qui concerne la distribution des genres dans ces différents phyla, l'analyse de l'ARN 16S (*Figure 35, p.147*) a révélé une évolution de la semaine 0 et la semaine 9 quelque soit le régime administré. En effet, pour le phylum *Bacteroidota,* une augmentation des genres *Bacteroides* et *Odoribacter* a été constaté, de même que pour le phylum *Desulfobacterota* où l'abondance de certains genres augmentent, tels que les *Bilophila* et *Desulfovibrio* entre S0 et S9 (*figure 36A, p.148*). En ce qui concerne le phylum des *Firmicutes* (*figure 36B, p.148*), des augmentations de l'abondance du genre *Blautia, Colidextribacter et Roseburia* de la semaine 0 à la semaine 9 dans tous les groupes de régime ont été observées. Néanmoins, l'abondance du genre *Lachnospiraceae NK4A136* (*figure 36B, p.148*) diminue de S0 à S9.

De façon plus significative pour les objectifs de l'étude, l'analyse de la composition du microbiote fécal à la semaine 9 a mis en évidence des différences entre les 3 groupes de régimes (*Figure 34, p.145*). L'analyse du phylum *Proteobacteria* (*Figure 35B, p.147*), a montré une augmentation du genre *Escherichia-Shigella* dans le microbiote des animaux nourris 9 semaines avec les régimes « Std-ARA » et « HL+ARA », qui n'est pas trouvé chez les animaux en semaine 0 ou dans le groupe « HL-ARA » en semaine 9. Les régimes modérément hyperlipidiques ont également montré une augmentation des *Bilophila* et et des *Blautia* comparé au groupe « Std-ARA » (*Figure 36, p.148*).

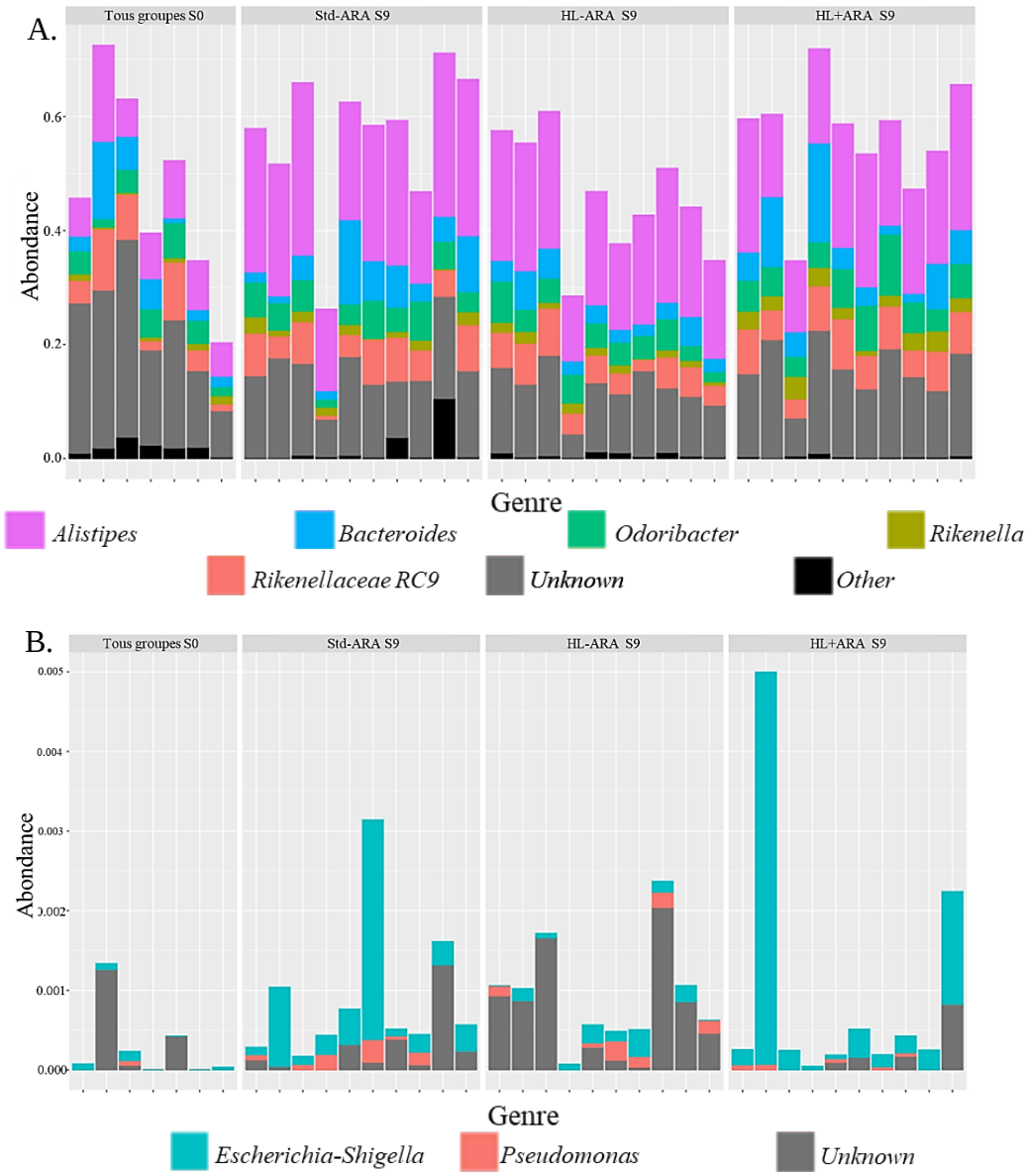


Figure 35: Distribution des phyla Bacteroidota (A) et Proteobacteria (B) du microbiote fécal en fonction des différents régimes.

Pour S0, N=7 animaux ; pour S9, N=30 (n=10 animaux par groupe). Graphique réalisé par Mme S. Auger unité MICALIS de l'INRA de Jouy-en-Josas. Genre Bacteroides : p-value < 0,000001 pour S0 vs « Std-ARA » S9 ; p-value=0,00012 pour S0 vs « HL-ARA » S9 et p-value < 0,000001 pour S0 vs « HL+ARA » S9. Genre Odoribacter : p-value = 0,02150 S0 pour vs « Std-ARA » S9 ; p-value = 0,00802 pour S0 vs « HL-ARA » S9 et p-value = 0,04557 pour S0 vs « HL+ARA » S9. Genre Escherichia-Shigella : p-value = 0,03585 pour S0 vs « Std-ARA » S9 ; p-value=0,01332 pour S0 vs « HL+ARA » S9.

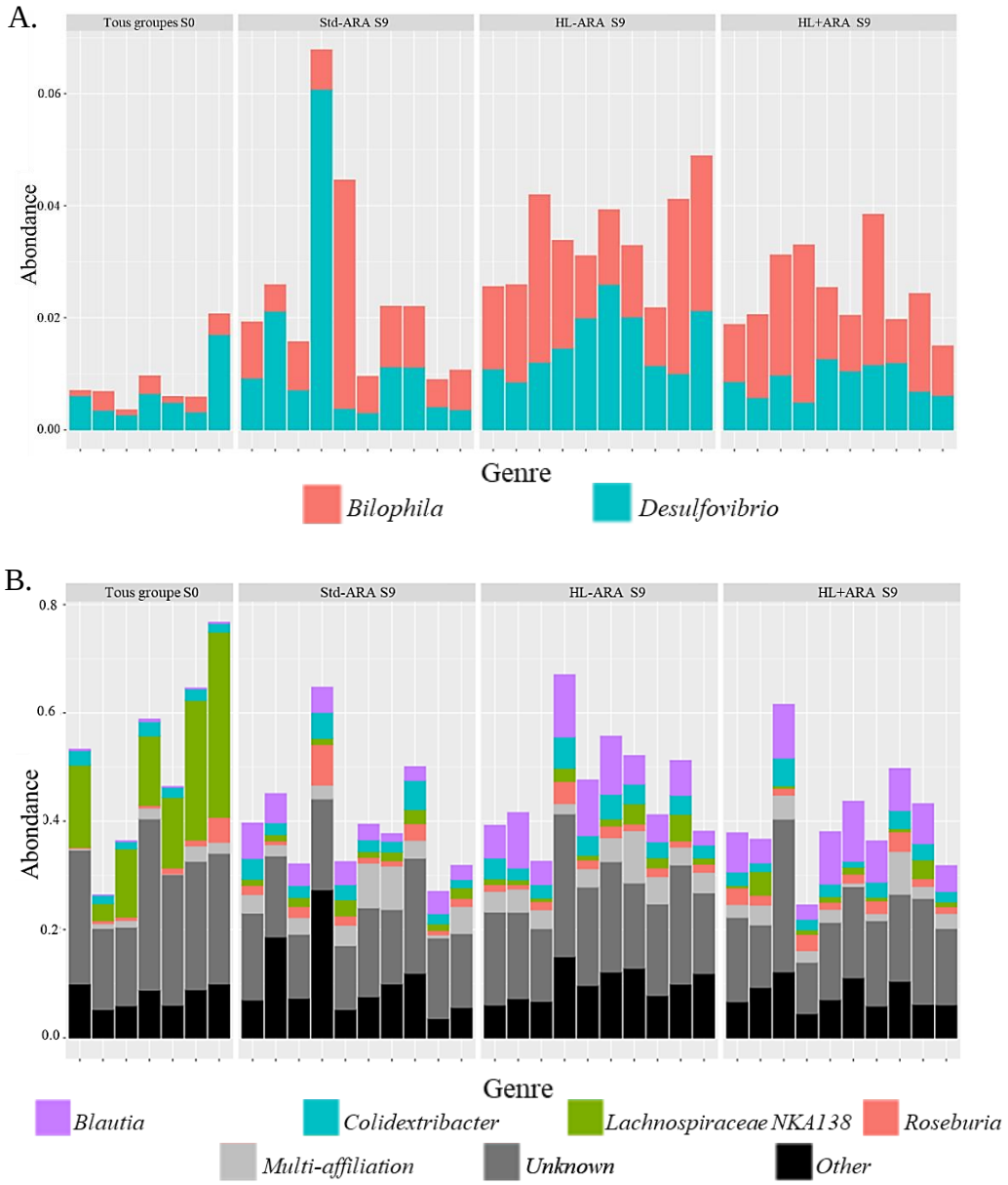


Figure 36 : Distribution des phyla Desulfobacterota (A) et Firmicutes (B) du microbiote fécal en fonction des différents régimes.

Pour S0, N=7 animaux ; pour S9, N=30 (n=10 animaux par groupe). Graphique réalisé par Mme S. Auger unité MICALIS de l'INRA de Jouy-en-Josas. Genre Bilophila : p-value = 0,00103 pour S0 vs « Std-ARA » S9 ; p-value = 0,00004 pour S0 vs « HL-ARA » S9 et p-value = 0,00026 pour S0 vs « HL+ARA » S9. Genre Desulfovibrio : p-value = 0,00028 pour S0 vs « Std-ARA » S9 ; p-value = 0,00189 pour S0 vs « HL-ARA » S9 et p-value<0,00001 pour S0 vs « HL+ARA » S9. Genre Blautia : p-value = 0,00531 pour S0 vs « Std-ARA » S9 ; p-value = 0,00033 pour S0 vs « HL-ARA » S9 et p-value = 0,00011 pour S0 vs « HL+ARA » S9. Genre Lachnospiraceae NK4A136 : p-value = 0,00551 pour S0 vs « Std-ARA » S9 ; p-value = 0,00092 pour S0 vs « HL-ARA » et p-value = 0,00115 pour S0 vs « HL+ARA » S9 ; p-value < 0,0001 pour « Std-ARA » S9 vs « HL-ARA » S9 ; p-value = 0,02204 pour « Std-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9 et p-value <0 ,0001 pour « HL-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9. Colidextribacter : p-value = 0,02154 pour S0 vs « Std-ARA » S9 ; p-value = 0,00182 pour S0 vs « HL-ARA » S9 et p-value = 0,02564 pour S0 vs « HL+ARA » S9. Roseburia : p-value = 0,0033 pour S0 vs « Std-ARA » S9 ; p-value = 0,00159 pour S0 vs « HL-ARA » S9 et p-value = 0,00045 pour S0 vs « HL+ARA » S9.

En outre dans le phylum des *Actinobacteria* qui apparait plus abondant pour les animaux nourris avec le régime « HL-ARA » durant 9 semaines (*Figure 34, p.145*), une augmentation du genre *Bifidobacterium* et plus précisément de l'espèce *Bifidobacterium pseudolongum* est observée pour ce seul groupe et non pour les souris ayant été nourries avec les autres régimes (*Figure 37*). Une augmentation de l'apport lipidique de 5% à 15% favoriserait possiblement cette espèce contrairement à l'apport alimentaire en ARA qui lui, supprimerait cette évolution et entrainerait un retour au microbiote fécal observé avec le régime « Std-ARA ».

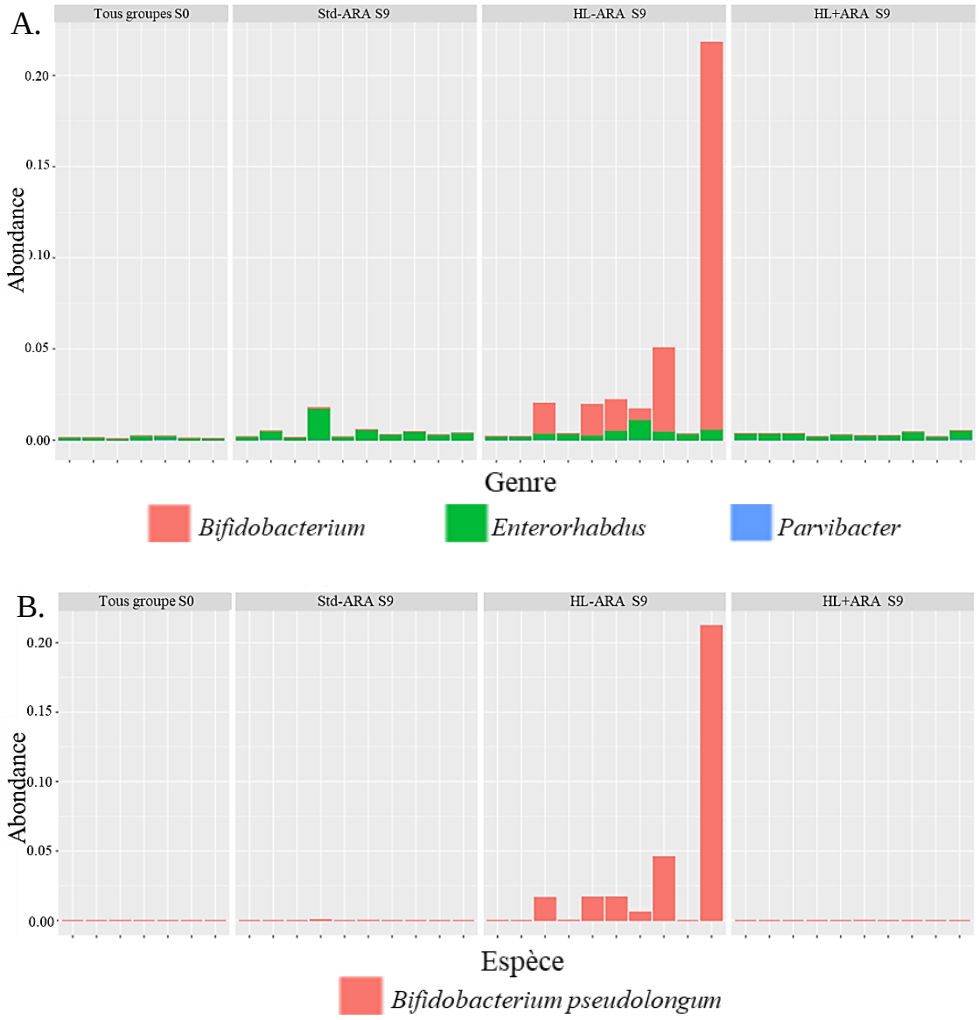


Figure 37 : Étude de la composition du microbiote fécal en Actinobacteria.

(A) *Les différents genres des Actinobacteria sont représentés et (B) Une étude plus approfondie a été réalisée afin de mettre en évidence l'espèce de Bifidobacteria pseudolongum présente dans le groupe « HL-ARA ». Pour S0, N=7 animaux ; pour S9, N=30 (n=10 animaux par groupe). Graphique réalisé par Mme S. Auger unité MICALIS de l'INRAE de Jouy-en-Josas. Bifidobacterium pseudolongum : p-value = 0,0008 pour S0 vs « HL-ARA » S9 ; p-value = 0,00187 pour « Std-ARA » S9 vs « HL-ARA » S9 ; p-value < 0,0001 pour « HL-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9.*

C. Etude des niveaux d'inflammation colique

1. *Mesure du taux de lipocaline-2 fécale*

Afin de déterminer la présence ou l'absence d'un état inflammatoire, nous avons mesuré les taux de Lcn-2, décrits comme un marqueur de l'inflammation colique chez la souris, notamment induite par le sulfate de dextran sodique (DSS) (Chassaing *et al.*, 2012). Les taux fécaux de Lcn-2 ont été mesurés en début de protocole expérimental (S0) et après 9 et 12 semaines de régime. Aucune différence n'a été mise en évidence à l'intérieur des 3 groupes aux différents temps ou entre les groupes (*Figure 38)*.

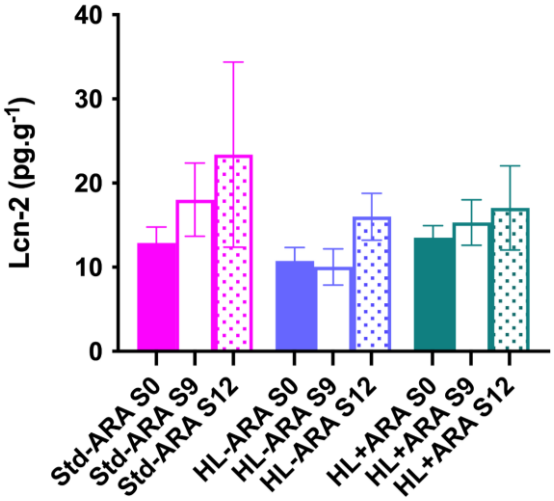


Figure 38 : Évaluation de la concentration de lipocaline-2 Lcn-2 dans les fèces des animaux en début de protocole (S0), après 9 et 12 semaines de régime.

N=24 (n=7-9 animaux par groupes). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM.

Ces résultats n'étant pas concluants et ne faisant référence qu'à un seul marqueur dans les fèces, nous avons fait le choix d'investiguer plus en détail la présence d'un état inflammatoire au niveau du colon. Notre attention s'est donc portée sur une technique de criblage de l'expression colique de 140 protéines impliquées dans l'inflammation.

2. *Etude de l'expression colique de protéines impliquées dans l'inflammation par la technique d'hybridation sur filtre (proteome profiler)*

Le dispositif utilisé pour le criblage des protéines impliquées dans l'inflammation a été celui du protéome profiler XL (*Figure 39, p.152*). Sur la membrane sont disposés en dupliquat

des anticorps dirigés contre des protéines ciblées dans l'homogénat de colon. Les *figures 39A* et *33B* (*p.152*) présentent le résultat typique obtenu après révélation d'une membrane ainsi que le schéma de disposition des anticorps dirigés contre les protéines ciblées. Les rectangles verts correspondent aux marqueurs positifs qui permettent de valider techniquement l'hybridation avec les protéines de l'homogénat utilisé. Les rectangles violets encadrent les duplicats des anticorps dirigés contre les protéines ciblées. Le rectangle rouge correspond à l'anticorps dirigé contre l'IL-1β, qui n'est pas ou peu exprimée dans l'homogénat employé, provenant de colons de souris nourries par le régime « HL-ARA ». Les niveaux d'expression sont exprimés par rapport à la moyenne des témoins positifs de la membrane du protéome profiler. L'hybridation a été réalisée en simplicat, expliquant l'absence de calcul de SEM dans la *figure 39C* (*p.152*) qui représente la synthèse des résultats pour l'hybridation avec les 3 homogénats de souris nourries respectivement avec les régimes « Std-ARA », « HL-ARA » et « HL+ARA ».

L'analyse de la plupart des résultats obtenus avec les trois membranes hybridées est résumée dans le tableau 6 (*p.153*). L'analyse a été réitérée sur des échantillons de colon d'animaux nourris durant 12 semaines de régime mais les résultats n'étant pas concluants, ils ne seront pas abordés. A des fins de publication, nous nous sommes essentiellement intéressés à l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, TNF-α et IL-12), anti-inflammatoire (IL-10) et les cibles Reg3-γ, CD40, Adiponectine, ICAM-1 dans le colon. Reg3-γ est lié à la mucine 2 (MUC-2) qui forme une couche de gel recouvrant la muqueuse intestinale afin de protéger la surface muqueuse et de jouer un rôle de lubrifiant notamment au niveau du gros intestin.

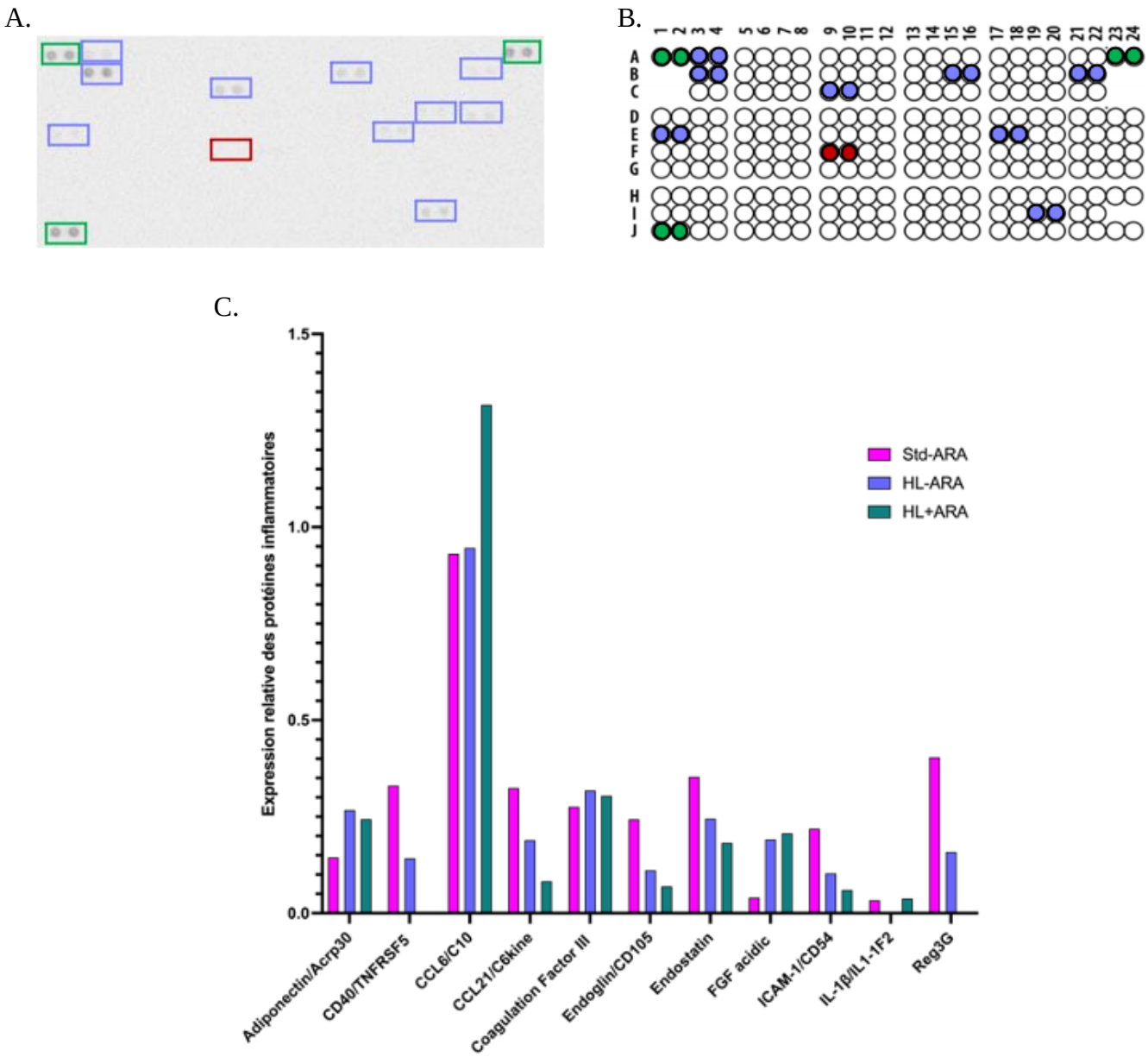


Figure 39: Screening de protéines inflammatoires du colon par l'intermédiaire du protéome profiler XL.

(A) Représentation d'une membrane de révélation pour les individus du groupe « HL-ARA ». (B) Schéma du patron de disposition des marqueurs de l'inflammation présents dans le groupe dont le code couleur renvoie à la partie (A) du graphique. Pour les légendes : A3-4 (adiponectin/Acrp30) ; B3-4 (CCL6/CCL10) ; B15-16 (CCL21/C6kine) ; B21-22 (CD40/TNFRSF5) ; C9-10 (Coagulation factor III) ; D19-20 (Endoglin/CD105) ; D21-22 (Endostatin) ; E1-2 (FGF-acidic) ; E17-18 (ICAM-1/CD54) ; F9-10 (IL-1β/IL-1F2) ; I19-20 (Reg3G). (C) Expression relative des protéines inflammatoires observées dans le colon après 9 semaines de régimes. Les résultats sont exprimés suivant le ratio de l'intensité du marqueur (de la protéine d'intérêt) sur l'intensité des contrôles internes de la membrane. N=9 (n=3 animaux par groupe et par membrane).

Tableau 6 : Récapitulatif des résultats du protéome profiler et données complémentaires.

Pour chaque cible protéique mise en évidence par le protéome profiler à 9 semaines de régime, une comparaison des régimes « HL+/-ARA » a été réalisée avec « Std-ARA ». Cette comparaison reste arbitraire et aucun test statistique n'a été réalisé en raison de la réalisation de la technique (en simplicat). Des données complémentaires sont données afin de mieux cerner le contexte de chaque cible et son utilisation potentielle dans ce projet de thèse. IL-1β : interleukine 1β ; Reg-3γ : Regenerating Family Member 3 Gamma ; CCL21/6Ckine : Chemokine (C-C motif) ligand 21 ; FGF-1 : fibroblast growth factor-1 ; ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1 ; CD40 : Cluster of differentiation 40.

Protéine cible	**Régime « HL-ARA » vs « Std-ARA » (100%)**	**Régime « HL+ARA » vs « Std-ARA » (100%)**	**Cellules exprimant protéine cible**	**Fonctions et rôles**
IL-1β	**100% ↓**	**0%**	Macrophages	Cytokine pro-inflammatoire.
Reg-3 γ	**63% ↓**	**100% ↓**	Cellules de Paneth, entérocytes, cellules caliciformes	Régime modérément hyperlipidique de 6 semaines diminuerait l'expression de Reg3γ et augmenterait la perméabilité iléale au LPS (Guerville *et al.*, 2017). Souris MUC2 KO aurait moins d'obésité sous régime high fat et plus haut niveau de sécrétion IL22 et expression Reg3γ dans le petit intestin et le colon (Hartmann *et al.*, 2016).
CCL21/6Ckine	**43% ↓**	**71% ↓**	Cellules endothéliales lymphatiques et veinules Fibroblastes réticulaires des noyaux lymphatiques	Ligand du récepteur CCR7 exprimé sur les cellules dendritiques. La liaison de CCR7 à CCL21 permet la maturation (capacité de présentation d'antigène) et la migration des cellules dendritiques vers les noyaux lymphatiques du mésentère (Vicari *et al.*, 2000). Effet angiostatique (Vicari *et al.*, 2000).
Adiponectine	**67% ↑**	**67% ↑**	Adipocytes Cellules de Paneth	Rôle pro-inflammatoire dans l'intestin (Weidinger *et al.*, 2018). Contradiction de la littérature sur les effets de l'adiponectine (Ouchi & Walsh, 2007). Certaines souches de Lactobacille induiraient son expression dans les cellules de Paneth via TRAF2 et 6 (Su *et al.*, 2015).

FGF-1	**20% ↑**	**20% ↑**	Gliales, Adipocytes, Endothéliales, entérocytes cancéreux	Limite le dépôt adipeux et diminue l'insulinorésistance (Gasser *et al.*, 2017). Une augmentation de MUC2 diminuerait la production de FGF-1 et la réparation tissulaire (Tawiah *et al.*, 2018).
ICAM-1	**50% ↓**	**75% ↓**	HT29 et entérocytes cancéreux Adipocytes	Augmentation de la transmigration des neutrophiles polynucléaires dans l'épithélium intestinal (Sumagin *et al.*, 2016). Augmentation de son expression par les régimes hyperlipidiques dans le tissu adipeux (Brake *et al.*, 2006).
CD40/ TNFRSF5	**57% ↓**	**100% ↓**	Cellules dendritiques (produisant de l'IL-6) des plaques de Peyer	Un des récepteurs au TNF. Induction inflammation colique (Ogrinc Wagner *et al.*, 2019). Axe CD40/CD40L important pour l'expansion des cellules B produisant de l'IL-10 (CSIF) sous le contrôle des mastocytes (Mion *et al.*, 2014).
Endogline/CD105	**60% ↓**	**80% ↓**	Cellulaire capillaire endothéliale Cellule interstitielle kit+ (de Cajal)	Récepteur TGFβ permettant angiogenèse. Souris hétérozygote Eng+/− sous régime hyperlipidique : réduction triglycéride hépatique et niveau insuline (Beiroa *et al.*, 2013).

3. Analyse de marqueurs de l'inflammation colique par RT-PCR quantitative

Afin de confirmer ou d'infirmer les variations des marqueurs inflammatoires identifiés dans les expériences avec le protéome profiler, des quantifications de ces cibles par RT-PCR ont été réalisées sur les ARNs extraits des échantillons coliques collectés après 9 et 12 semaines de régime. Les cytokines IL-6 et TNF-α ont été ajoutées à nos analyses. La *figure 40* montre les quantifications obtenues pour l'IL1β, l'IL-6 et le TNFα.

Les taux d'ARNm de l'IL-1β et de TNF-α dans le groupe « HL+ARA » augmentent respectivement de 11,8 fois et de 4,1 fois pour l'IL-1β et de 3,4 et 2 fois en moyenne en comparaison aux groupes « Std-ARA » et « HL-ARA » après 9 semaines de régime. Une diminution de l'expression de l'IL-1β et du TNF-α a été observée entre S9 et S12 pour les groupes « HL-ARA » (soit 3,1 et 1,4 fois pour les moyennes respectives) et « HL+ARA » (soit 34,8 fois et 16,4 pour les moyennes respectives) (*Figures 40 A & C*). Cependant, aucune variation n'a été relevée en ce qui concerne l'expression de l'IL-6 pour l'ensemble des groupes de régime ainsi que les différentes semaines du protocole (*Figure 40B*).

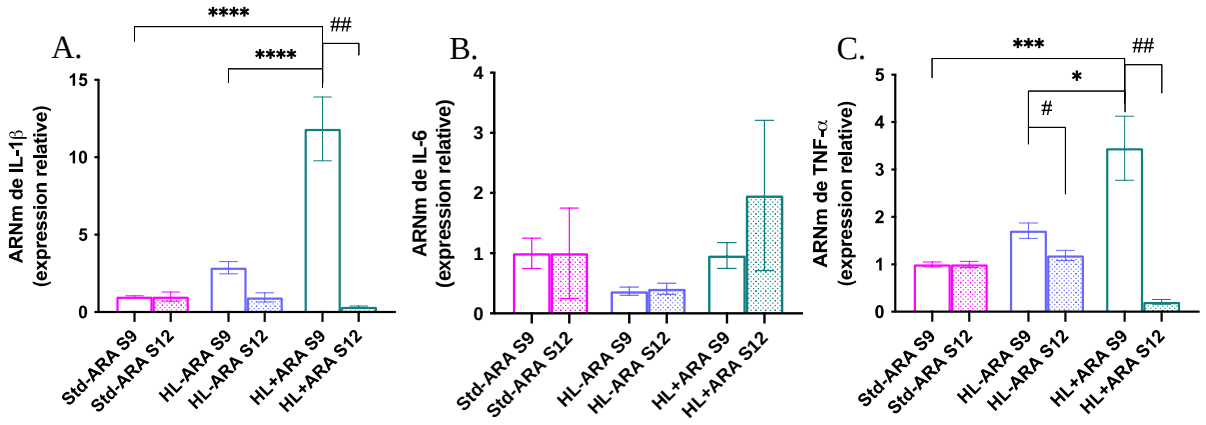


Figure 40: Évaluation de l'expression génique de l'IL-1β (A.), de l'IL-6 (B) et du TNF-α (C.) sur des échantillons de colon après 9 et 12 semaines de régime.

*N=15 pour S9 (n=5 animaux par groupe) et N=12 pour S12 (n=4 animaux par groupe), réalisés en duplicat. La comparaison statistique entre deux groupes de régimes différents de même semaine est symbolisée par « * ». La comparaison statistique intragroupe entre la semaine 9 et 12 est symbolisée par « # ». * p-value <0,05; *** p-value <0,001 et **** p value <0,00001. # p-value <0,05; ## p-value <0,01. Les résultats sont exprimés sous forme sous forme moyenne ± SEM. IL-1β : p-value < 0,0001 pour « Std-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9 ; p-value < 0,0001 pour « HL-ARA » S9 vs « HL+ARA S9 » ; p-value = 0,0060 pour « HL+ARA » S9 vs « HL+ARA » S12. TNF-α : p-value = 0,0006 pour « Std-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9; p-value=0,0146 pour « HL-ARA » S9 vs « HL-ARA » S12 ; p-value = 0,0019 pour « HL+ARA » S9 vs « HL+ARA » S12*

A la suite de cette première série de RT-qPCR, une étude de la présence de l'IL-1β dans des homogénats de colon par technique ELISA a été effectuée afin de valider les différences observées par l'étude de l'expression génique. En raison d'un problème de validité et de proportionnalité des résultats lors de la validation du kit ELISA sur des échantillons de colon (et de foie), nous n'avons pu aboutir à une exploitation satisfaisante des résultats.

La *figure 41* présente les quantifications des taux d'ARNm de CD40, de l'adiponectine et de ICAM-1. Les niveaux d'expression de CD40 et de l'adiponectine augmentent respectivement de 5,8 fois et de 7,6 fois en moyenne dans le groupe « HL+ARA » par rapport au groupe « Std-ARA » (*Figures 41 A & B*). En ce qui concerne l'expression de ICAM-1 (*Figure 41C*), la variabilité inter-individuelle observée dans le groupe « HL+ARA » ne nous permet pas de mettre en évidence une différence entre les groupes après 9 semaines de régime. En revanche, après 12 semaines de régime, l'expression relative de ICAM-1 est 5,7 fois plus importante en moyenne dans le groupe « HL+ARA » que dans le groupe « Std-ARA » (*Figure 41C*).

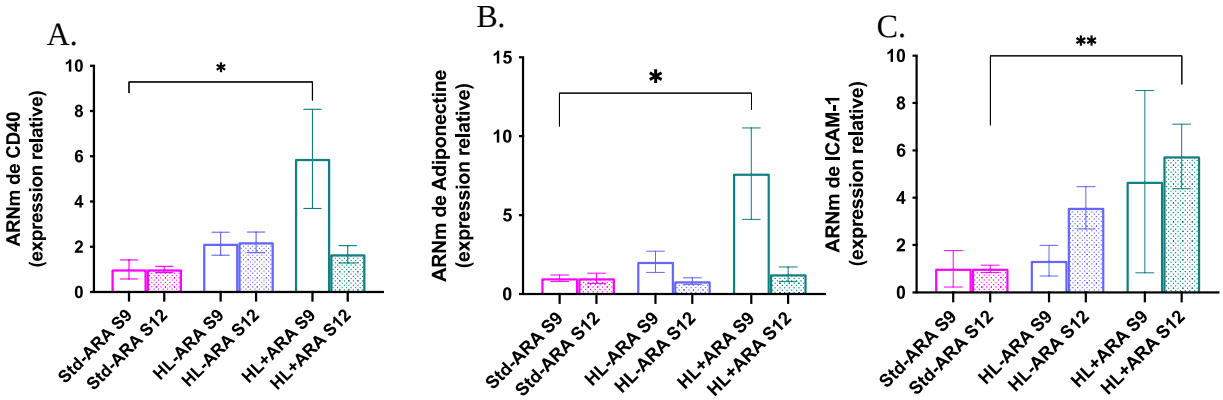


Figure 41: Évaluation de l'expression génique de CD40 (A), de l'adiponectine (B) et de ICAM-1 (C) sur des échantillons de colon après 9 et 12 semaines de régime.

*N=15 pour S9 (n=5 animaux par groupe) et N=12 pour S12 (n=4 animaux par groupe), réalisés en duplicat. La comparaison statistique entre deux groupes de régimes différents de même semaine est symbolisée par « * ». La comparaison statistique intragroupe entre la semaine 9 et 12 est symbolisée par « # ». * p-value <0,05 et ## p-value <0,01. Les résultats sont exprimés sous forme sous forme moyenne ± SEM. Respectivement. CD40 : p-value = 0,0424 « Std-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9. Adiponectine : p-value = 0,0337 « Std-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9. ICAM-1 : p-value= 0,0056 « HL+ARA » S12 vs « Std-ARA » S12.*

Les mesures des taux d'ARNm de l'IL-12 et de MUC2 n'ont pas montré de différence entre les groupes de régimes et entre les temps S9 et S12 en partie due pour l'IL-12 a une trop grande variabilité inter-individuelle. En ce qui concerne l'amorce Reg3-γ, la mise au point n'étant pas optimale (amorce ne nous apportant pas un seul produit PCR, pas de température

d'hybridation optimale, etc), cela a limité les résultats de cette cible. Les résultats des niveaux d'ARNm de l'IL-12, Reg3γ et MUC2 ne seront donc pas abordés ici.

4. Étude de la barrière colique après 9 et 12 semaines de régime

Afin d'étudier l'impact des régimes sur la barrière colique, des mesures des niveaux d'expression par RT-qPCR de deux protéines constituant les jonctions serrées (claudine 1 et occludine) ont été réalisées (Garcia-Hernandez *et al.*, 2017). Ces analyses ont montré une augmentation de l'expression de la claudine 1 (*Figure 42A, p.158*) d'environ 2 fois dans les groupes « HL-ARA » et « HL+ARA » après 9 semaines de régime par rapport au groupe « Std-ARA ». Après 12 semaines de régime, le niveau d'expression de la claudine 1 est plus élevé pour le groupe « HL-ARA » comparé aux deux autres groupes (de 4,8 fois en moyenne par rapport au groupe « Std-ARA » et 5,9 fois par rapport au groupe « HL+ARA »).

Pour l'occludine (*Figure 42B, p.158*), une augmentation de son expression est observée pour les animaux du groupe « HL+ARA » en comparaison avec les deux autres groupes de régime après 9 semaines (de 5,8 fois en moyenne par rapport au groupe « Std-ARA » et de 2,6 fois par rapport au groupe « HL-ARA »). Après 12 semaines de régime, les taux d'ARNm de l'occludine dans le groupe « HL+ARA » sont revenus aux niveaux observés dans les deux autres groupes à 9 semaines.

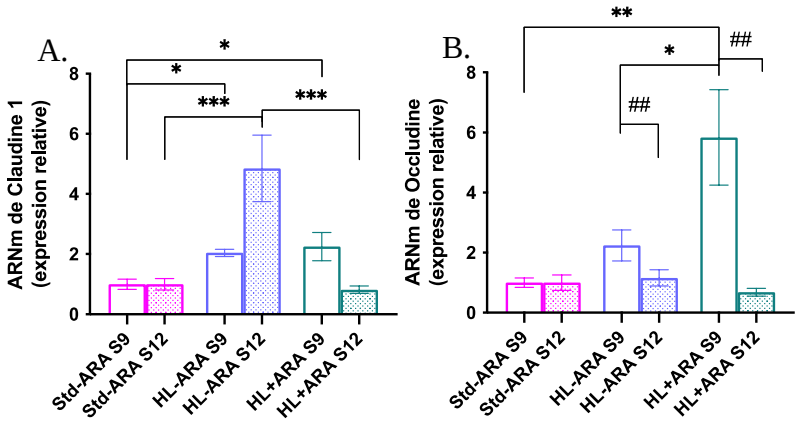


Figure 42: Évaluation de l'expression génique de la claudine 1 (A) et de l'occludine (B) sur des échantillons de colon après 9 et 12 semaines de régime.

*N=15 pour S9 (n=5 animaux par groupe) et N=12 pour S12 (n=4 animaux par groupe), réalisés en duplicat. La comparaison statistique entre deux groupes de régimes différents de même semaine est symbolisée par « * ». La comparaison statistique intragroupe entre la semaine 9 et 12 est symbolisée par « # ». * p-value <0,05 ; ** p-value <0,01 ; *** p-value <0,001. ## p-value <0,01. Les résultats sont exprimés sous forme sous forme moyenne ± SEM. Claudine 1 : p-value = 0,0376 pour « Std-AR A » vs « HL-ARA » S9 et p-value = 0,0171 pour « Std-ARA » vs « HL+ARA » S9 ; p-value = 0,0009 pour « Std-ARA » S12 vs « HL-ARA » S12 et p-value = 0,0008 pour « Std-ARA » S12 vs « HL+ARA » S12. Occludine : p-value = 0,0045 pour « Std-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9 et p-value = 0,0279 pour « HL-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9 ; p-value = 0,0052 « HL-ARA » S9 vs « HL-ARA » S12 et p-value=0,0018 « HL+ARA » S9 vs « HL+ARA » S12.*

D. Communication intestin-cerveau : niveau d'inflammation systémique

1. Expression hépatique des cytokines IL-1β, IL-6 et TNF-α

Une étude de l'inflammation a été menée sur des échantillons de foie d'animaux nourris durant 9 ou 12 semaines avec l'un des trois régimes alimentaires. L'étude s'est centrée sur l'analyse des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-6 et TNF-α (*Figure 43, p.159*).

Aucune différence n'a été observée pour l'expression de l'IL-1β entre les 3 groupes en partie due à une grande variabilité inter-individuelle dans certains groupes (*Figure 43A, p.159*). En ce qui concerne l'IL-6, aucune conclusion ne peut être apportée concernant les résultats après 9 semaines de régime en raison de la forte variabilité inter-individuelle rencontrée (*Figure 43B, p.159*). En revanche, l'analyse statistique a révélé une différence pour la semaine 12 avec une augmentation de l'expression relative des ARNm de l'IL-6 du groupe « HL-ARA » de 5,2 fois par rapport au groupe « Std-ARA » et de 3 fois en moyenne par rapport au groupe « HL+ARA » (*Figure 43B, p.159*). Pour l'étude du TNF-α (*Figure 43C, p.159*), l'étude par

RT-qPCR a montré une augmentation des taux d'ARNm dans le groupe « HL+ARA » entre les semaines 9 et 12 du protocole de 14,6 fois en moyenne.

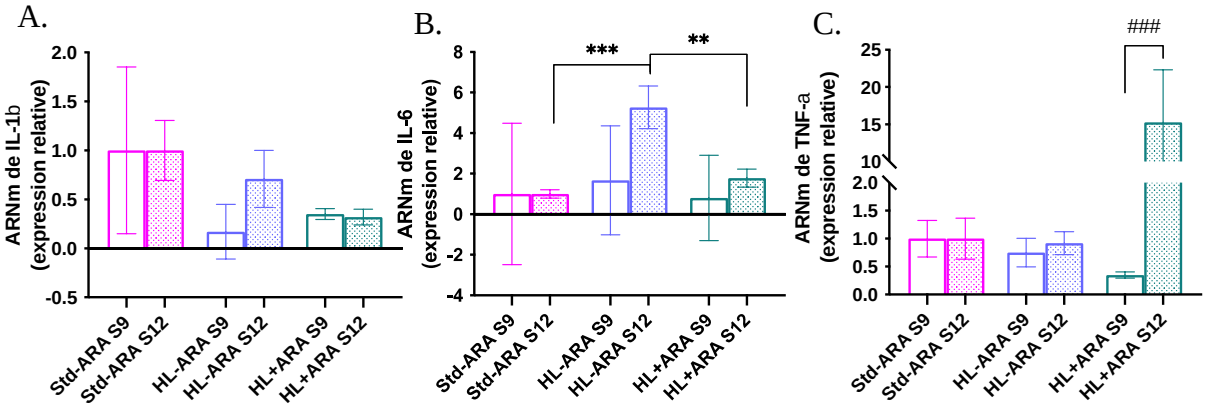


Figure 43: Évaluation de l'expression génique de l'IL-1β (A.), de l'IL-6 (B) et du TNF-α (C) sur des échantillons de foie après 9 et 12 semaines de régime.

*N=15 pour S9 (n=5 animaux par groupe) et N=12 pour S12 (n=4 animaux par groupe), réalisés en duplicat. La comparaison statistique entre deux groupes de régimes différents de même semaine est symbolisée par « * ». La comparaison statistique intragroupe entre la semaine 9 et 12 est symbolisée par « # ». ** p-value <0,01 ; *** p-value <0,001. ## p-value <0,01 ; ### p-value <0,001. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM. IL-6 : p-value = 0,0004 pour « Std-ARA » S12 vs « HL-ARA » S12 et p-value = 0,0021 pour « HL-ARA » S12 vs « HL+ARA » S12. TNF-α : p-value = 0,0005 « HL+ARA » S9 vs « HL+ARA » S12.*

2. Expression des cytokines IL-1β, IL-6 et TNF-α dans le tissu adipeux mésentérique

L'analyse des résultats RT-qPCR sur des échantillons de tissu adipeux mésentérique n'ont montré aucune différence significative de l'expression de l'IL-1β après 9 et 12 semaines de régime pour l'ensemble des groupes en raison de fortes variabilités inter-individuelles (*Figure 44A, p.160*). Aucune différence statistique n'a été observée concernant l'expression de l'IL-6 pour les animaux nourris durant 9 semaines avec l'ensemble des trois régimes (*Figure 44B, p.160*). Chez les animaux nourris durant 12 semaines pour le groupe « HL-ARA », l'expression de l'IL-6 est considérablement augmentée de 217,4 en moyenne par rapport au groupe « Std-ARA » (et 83,6 fois en moyenne comparé au groupe « HL+ARA »).

Pour l'expression du TNF-α, aucune différence entre les groupes « HL+ARA » et « Std-ARA » n'a été mise en évidence mais le groupe « HL-ARA » présente des niveaux plus importants après 9 semaines de régime de l'ordre de 8,1 et 19,2 fois en moyenne comparé aux groupes « Std-ARA » et « HL+ARA » (*Figure 44C, p.160*). A l'inverse, après 12 semaines de régime, ce phénomène disparait. De plus, une augmentation des taux d'ARNm de TNF-α pour le groupe « HL+ARA » de 24,3 fois en moyenne par rapport au groupe « Std-ARA » (et de 7,8

fois en moyenne comparé à « HL-ARA ») apparait (*Figure 44C*). Les résultats de l'étude du tissu adipeux mésentérique montrent ainsi des modifications de l'expression génique de certaines cytokines au cours du temps lorsque les animaux sont nourris avec différents régimes. C'est pourquoi nous nous sommes également intéressés à l'expression de ces mêmes cytokines dans le tissu adipeux épididymaire.

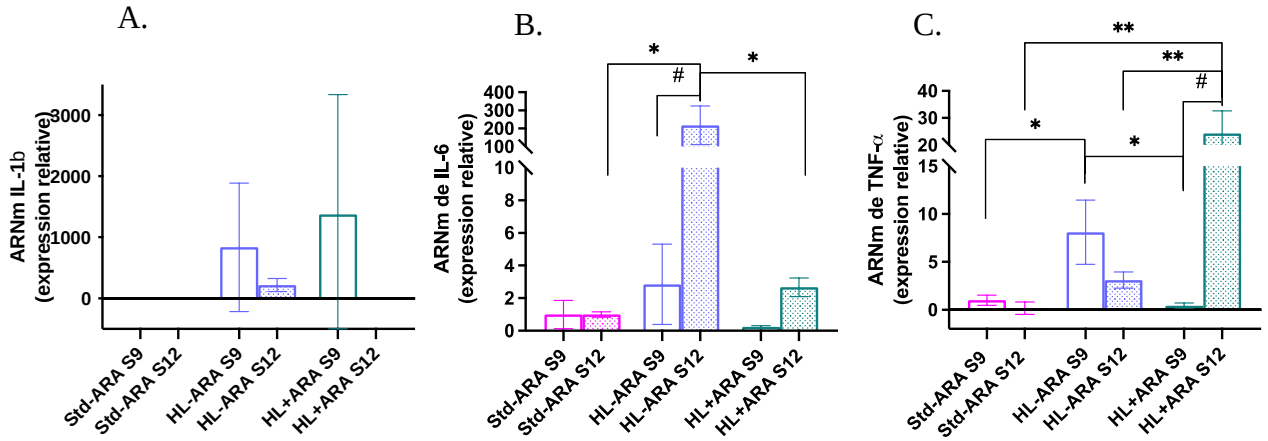


Figure 44 : Évaluation de l'expression génique de l'IL-1β (A), de l'IL-6 (B) et du TNF-α (C) sur des échantillons de tissu adipeux mésentérique après 9 et 12 semaines de régime.

*N=15 pour S9 (n=5 animaux par groupe) et N=12 pour S12 (n=4 animaux par groupe), réalisés en duplicat. La comparaison statistique entre deux groupes de régimes différents de même semaine est symbolisée par « * ». La comparaison statistique intragroupe entre la semaine 9 et 12 est symbolisée par « # ». ** p-value <0,01 ; *** p-value <0,001. ## p-value <0,01 ; ### p-value <0,001. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM. IL-6 : p-value = 0,0442 pour « Std-ARA S12 » vs « HL-ARA » S12 et p-value = 0,0443 pour « HL-ARA » S12 vs « HL+ARA » S12 ; p-value = 0,0473 pour « HL-ARA » S9 vs « HL-ARA » S12. TNF-α : p-value = 0,0330 pour « Std-ARA » S9 vs « HL-ARA » S9 et p-value = 0,0303 pour « HL-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9 ; p-value = 0,0046 pour « Std-ARA » S12 vs « HL+ARA » S12 ; p-value = 0,0091 pour « HL-ARA » S12 vs « HL+ARA » S12 et p-value = 0,0309 pour « HL+ARA » S9 vs « HL+ARA » S12.*

3. Expression génique des cytokines IL-1β, IL-6 et TNF-α dans le tissu adipeux épididymaire

Compte tenu de la grande variation inter-individuelle dans certains groupes expérimentaux, aucune différence n'a été observée pour l'ensemble des groupes après 9 et 12 semaines de régime en ce qui concerne l'expression relative de l'IL-1β et de l'IL-6 (*Figures 45A et B, p.161*).

Aucune différence n'a été relevée entre les groupes après 9 semaines de régime pour l'expression génique du TNF-α. En revanche, une diminution significative de l'expression de TNF-α du groupe « HL+ARA » (de l'ordre de 7,6 fois) a été mis en évidence à S12 comparé

au groupe « Std-ARA ». Une diminution de l'expression relative de l'ordre de 10 fois du TNF-α est également présente entre 9 et 12 semaines pour le groupe « HL+ARA » (*Figure 45C*).

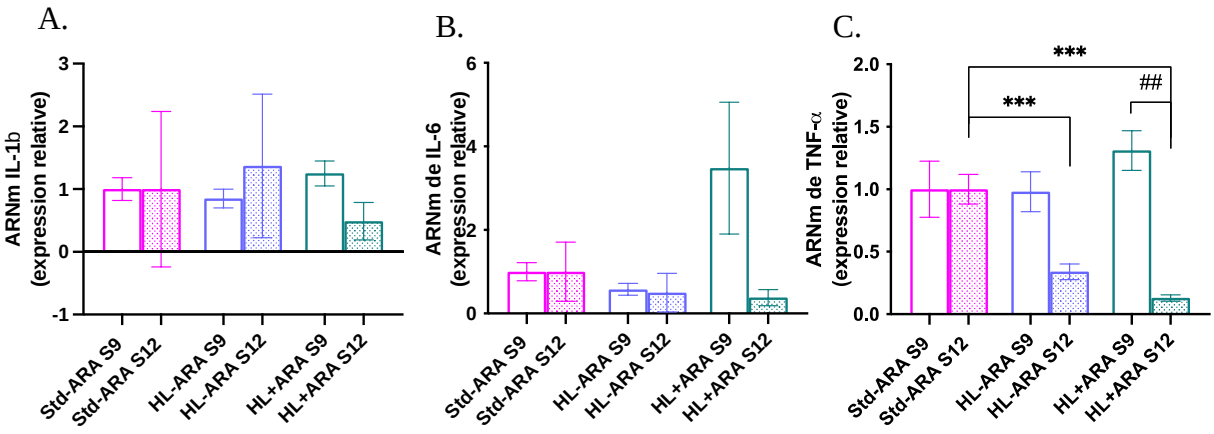


Figure 45 : Évaluation de l'expression génique de l'IL-1β (A), de l'IL-6 (B) et du TNF-α (C) sur des échantillons de tissu adipeux épididymaire après 9 et 12 semaines de régime.

*La GAPDH est réalisée en tant que contrôle interne. N=15 pour S9 (n=5 animaux par groupe) et N=12 pour S12 (n=4 animaux par groupe), réalisés en duplicat. La comparaison statistique entre deux groupes de régimes différents de même semaine est symbolisée par « * ». La comparaison statistique intragroupe entre la semaine 9 et 12 est symbolisée par « # ». *** p-value <0,001. ## p-value <0,01. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM. TNF-α : p-value < 0,0001 « Std-ARA » S12 vs « HL-ARA » S12 ; p-value < 0,0001 « Std-ARA » S12 vs « HL+ARA » S12 ; p-value = 0,0039 pour « HL+ARA » S9 vs « HL+ARA » S12.*

4. Impact cérébral

a. Perméabilité de la BHE après 12 semaines de régime

La perméabilité de la BHE a été évaluée sur le principe du passage d'un fluorochrome du compartiment périphérique au compartiment central. Les échantillons de sérums et d'homogénats de cerveau prélevés sur des souris nourries durant 12 semaines avec l'un des trois régimes ont été dosés par fluorimétrie. Un ratio de fluorescence cerveau/sérum a été calculé afin de mettre en évidence une altération de la BHE traduisant le passage du fluorochrome du sang vers le compartiment cérébral (*Figure 46, p.162*). Il n'apparait aucune modification de la perméabilité de la BHE pour l'ensemble des groupes de régime.

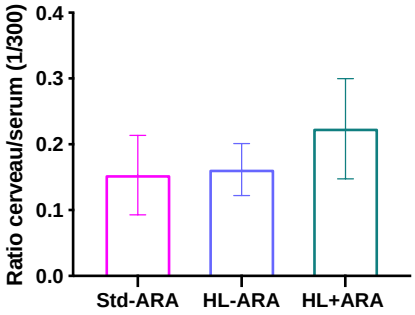


Figure 46 : Évaluation de la perméabilité de la BHE des différents groupes de régime par fluorimétrie.

Aucune altération de la perméabilité de la BHE n'est observée entre nos groupes expérimentaux. N=11 (n=3-4 animaux par groupe). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM.

b. Évaluation de l'expression génique des cytokines dans le cerveau de souris nourries 9 semaines

Une étude de l'expression génique des cytokines (IL-1β, IL-6, IL-12), et de CD40 sur des ARNs extraits de demi-cerveaux de souris a été réalisée dans les différents groupes de souris après 9 semaines de régime (*Figure 47, p.163*). Les mesures des taux d'ARNm de TNF-α par RT-qPCR n'ont pas donné de résultats exploitables et seuls les résultats des autres marqueurs sont présentés ci-dessous. Aucune différence entre les groupes de régime après 9 semaines n'a été relevée pour l'expression de l'IL-1β quel que soit le régime (*Figure 47A, p.163*). En revanche, les groupes « HL-ARA » et « HL+ARA » présentent une diminution significative de l'expression relative de l'IL-6 (de 1,9 et 3,4 fois en moyenne respectivement), de l'IL-12 (de 20 et 16,6 respectivement) et de CD40 (de 2,1 et 2,6 respectivement) en comparaison avec le groupe « Std-ARA » (*Figure 47B, C & D, p.163*).

Afin de compléter l'exploration du statut neuroinflammatoire des animaux soumis à l'étude, nous avons étudié les niveaux d'expression de marqueurs des cellules microgliales et des astocytes dans les hippocampes et le cortex cérébral par Western-Blot.

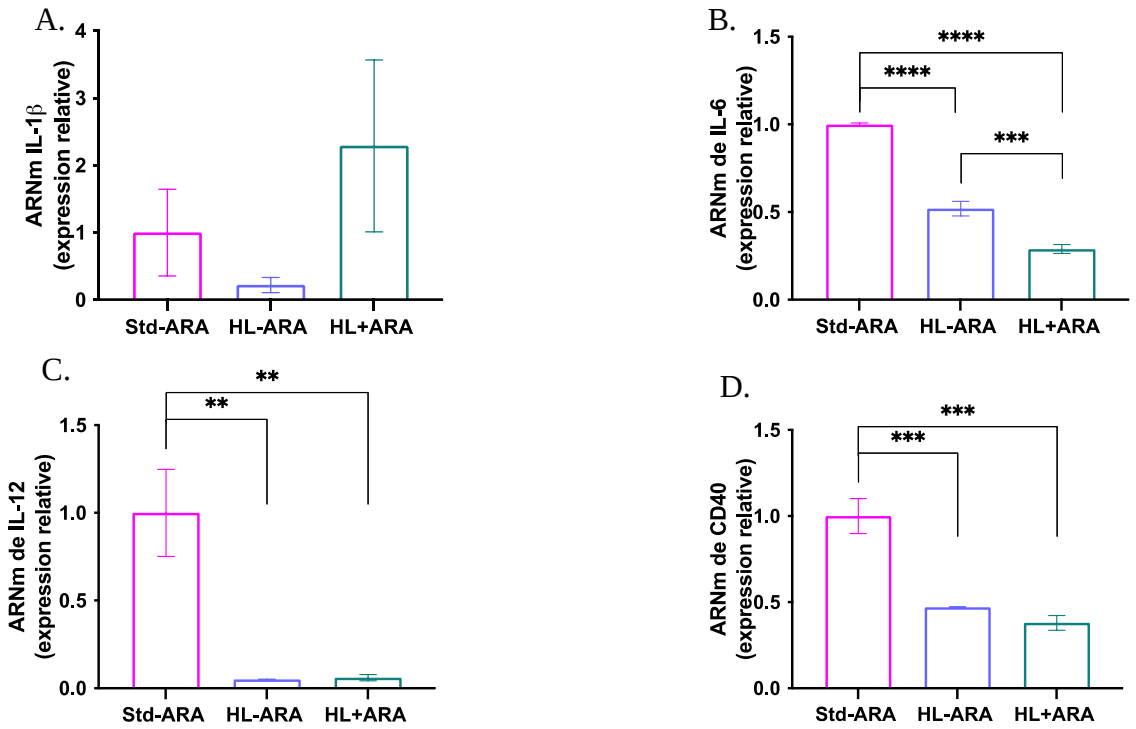


Figure 47 : Évaluation de l'expression génique de l'IL-1β (A), de l'IL-6 (B), de l'IL-12 (C) et de CD40 (D) sur des échantillons de cerveau après 9 semaines de régime.

*N=6 (n=2 animaux par groupe) réalisés en duplicat. La comparaison statistique entre deux groupes de régimes différents de même semaine est symbolisée par « * ». ** p-value <0,01 ; *** p-value <0,001 ; **** p-value <0,0001. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM. IL-6 : p-value < 0,0001 pour « Std-ARA » S9 vs « HL-ARA » S9 ; p-value < 0,0001 pour « Std-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9 et p-value = 0,0003 pour « HL-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9. IL-12 : p-value = 0,0034 pour « Std-ARA » S9 vs « HL-ARA S9 » et p-value = 0,0034 pour « Std-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9. CD40 : p-value = 0,0005 pour « Std-ARA S9 » vs « HL-ARA » S9 et p-value = 0,0002 « Std-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9.*

c. Analyse de la présence protéique de la GFAP et Iba1 dans le cortex cérébral et les hippocampes

Une étude de l'expression de la GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*, un filament intermédiaire présent dans certaines cellules gliales du système nerveux central telles que les astrocytes) et de Iba1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*, une protéine liant le calcium spécifique aux cellules microgliales et macrophages) par Western-Blot a été réalisée dans le cortex et les hippocampes des souris nourries avec les 3 régimes alimentaires durant 9 semaines. Cette évaluation de l'expression protéique de la GFAP a également été complétée par une analyse immunohistochimique dans différentes régions du cerveau.

Les niveaux de GFAP sont augmentés (*Figures 48A et D, p.164*) de 1,4 fois et de 1,8 respectivement en moyenne dans le cortex et les hippocampes des souris du groupe

« HL+ARA » par rapport aux souris du groupe « Std-ARA ». Cependant, l'expression de la GFAP ne varie pas dans le cortex et les hippocampes des souris du groupe « HL-ARA » par rapport à celle observée chez les souris du groupe contrôle « Std-ARA ». Aucune différence n'a été observée concernant les niveaux de Iba1 dans le cortex et les hippocampes des animaux nourris avec le régime « HL+ARA » (*Figure 48B & E*).

Nous avons cherché à apporter une analyse complémentaire des résultats observés en Western-Blot pour la GFAP par la technique d'immunohistochimie sur coupes de cerveau dans l'hippocampe et le cortex. Les résultats observés en immunohistochimie sont présentés en *figure 49*. Ces photographies n'ont pas été quantifiées mais montrent une visuellement une augmentation de la GFAP dans l'hippocampe d'animaux nourris avec les régimes « HL-ARA » et « HL+ARA », ce qui encourage de futures recherches complémentaires (*Figure 49, p.165*).

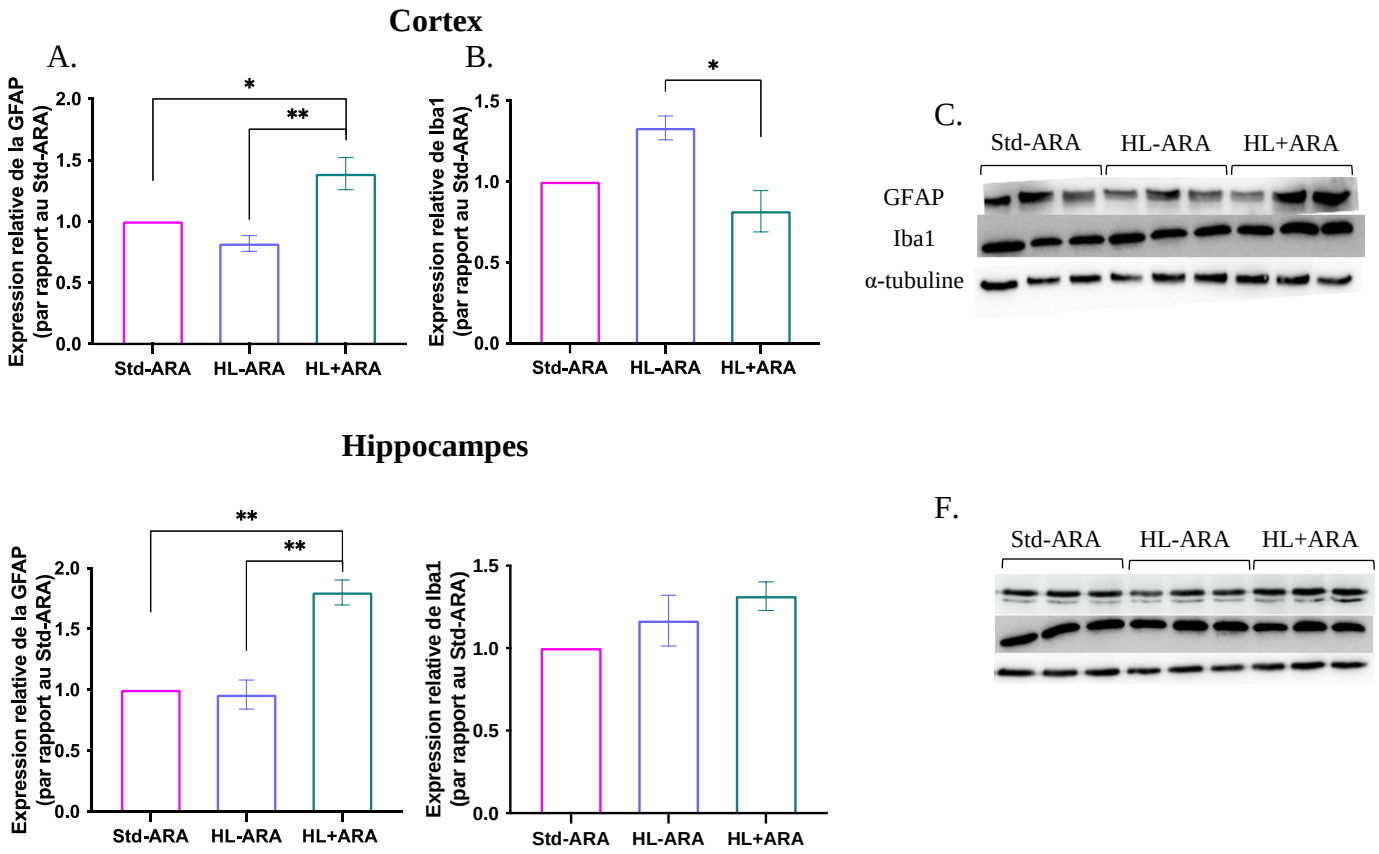


Figure 48 : Évaluation par Western Blot de l'expression relative de la GFAP et de l'IBA1 dans le cortex (A., B. et C.) et les hippocampes (D., E. et F.) des différents groupes de régimes.

*L'α-tubuline sert de protéine contrôle de charge. N=9 (n=3 animaux par groupe), réalisé en triplicat. La comparaison statistique entre deux groupes de régimes différents de même semaine est symbolisée par « * ». * p-value <0,05 ; ** p-value <0,01 ; *** p-value <0,001. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM. GFAP : cortex : p-value = 0,0338 pour « Std-ARA » S9 vs « HL-ARA » S9 et p-value = 0,0092 pour « HL-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9 et hippocampes: p-value = 0,0019 pour « Std-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9 et p-value = 0,0019 pour « HL-ARA » S9 vs « HL+ARA » S9. Iba1 : p-value = 0,0156 pour « HL-ARA » S9 vs « HL+ARA S9 »).*

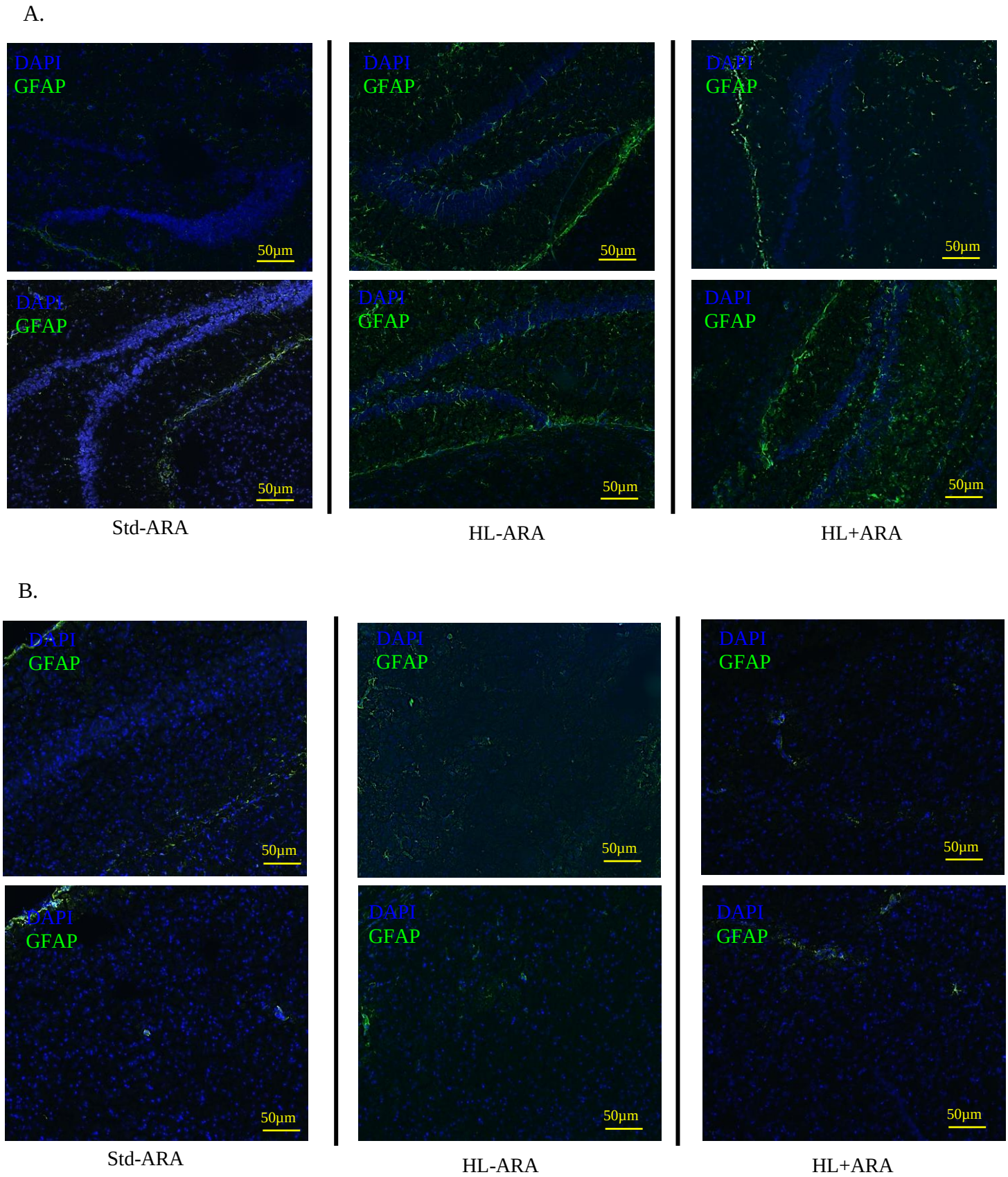


Figure 49 : Photographies d'hippocampe (A) et de cortex cingulaire (B) à la suite d'immunohistochimies ciblant la GFAP sur coupe de cerveaux. Les différents groupes sont séparés par une ligne. n=2 animaux/groupe.

IV. Discussion

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier les effets d'une alimentation enrichie en ARA sur la relation intestin-cerveau au travers de l'effet sur le microbiote fécal, le colon, le foie, le tissu adipeux et le cerveau.

Au début de ce projet, nous avions trois enjeux principaux :

- Les régimes alimentaires modérément hyperlipidiques enrichis ou non en ARA ont-ils un impact sur le microbiote fécal à l'origine d'une dysbiose intestinale ?
- Cette dysbiose intestinale a-elle des répercussions sur la barrière intestinale et entraine-elle une inflammation de bas grade intestinal élargis à d'autres organes ?
- Cette inflammation de bas grade a-elle des effets sur la perméabilité de la BHE ainsi que sur l'inflammation cérébrale ?

Après avoir réalisé l'ensemble des expérimentations *in vivo* et *ex vivo*, nous avons obtenu différents résultats importants qui seront discutés dans cette partie :

1) dans le microbiote fécal, nous avons observé de manière générale une diminution de la diversité microbienne entre 0 et 9 semaines, sans différence entre les trois régimes. Après 9 semaines de régime l'enrichissement en ARA semble inhiber la croissance des *Bifidobacterium pseudolongum* observée dans le régime « HL-ARA » et favoriser le genre *E. Shigella*,
2) plusieurs gènes inflammatoires sont induits lors de l'administration du régime « HL+ARA » notamment après 9 semaines de régime. Les régimes modérément hyperlipidiques semblent moduler l'intégrité de la barrière intestinale,
3) au niveau systémique, peu de modifications du profil inflammatoire dans le foie ont été observées. En revanche, de fortes variations sont mises en évidence dans le tissu adipeux mésentérique,
4) le profil inflammatoire observé dans le cerveau total est diminué, mais des modifications de marqueurs astrocytaires dans le cortex et l'hippocampe sont mises en évidence dans le groupe « HL+ARA ».

Ces expériences ont permis dans l'ensemble de répondre à nos principaux questionnements et ont ouverts des pistes de discussion intéressants présentées dans cette partie.

A. Impact des régimes alimentaires sur le microbiote fécal

La diversité du microbiote fécal de l'ensemble des souris inclus dans notre étude s'est vue diminuée entre le début du protocole expérimental et après 9 semaines quel que soit le régime administré (voir *Figure 32, p.144*). Cette diminution de la diversité peut s'expliquer par l'implantation d'un nouveau microbiote après le début du protocole qui n'est pas exclusivement une conséquence directe de l'alimentation des animaux. En effet, plusieurs auteurs ont observé le même phénomène chez des animaux nourris avec différents régimes alimentaires (Daniel *et al.*, 2014; Zhang & Li, 2018). Les conditions d'hébergements étant standardisées dans les établissements, il est possible que cette diminution de la diversité du microbiote soit engendrée non pas uniquement par l'alimentation mais également par l'environnement de l'animal en lui-même, à savoir l'eau de boisson, les différents composants de la cage et enrichissements, ou encore la composition de litière (Bleich & Hansen, 2012; Ma *et al.*, 2012). L'ensemble de ces éléments peuvent ainsi, lors de l'installation de l'animal dans la nouvelle structure d'accueil, implanter un nouveau microbiote qui évoluera en fonction du temps suivant les traitements/régimes administrés aux animaux. L'analyse du microbiote fécal a également révélé, en début de protocole, une variabilité inter-individuelle non négligeable pour l'ensemble des animaux induit en partie par l'appartenance des animaux à des portées différentes.

Le résultat le plus marquant concerne les modifications de la composition du microbiote par l'apport alimentaire en ARA avec les modifications inter-groupes observées pour l'abondance de l'espèce *Bifidobacterium pseudolongum* (voir *Figure 37, p.149*) et du genre *Escherichia-Shigella* (voir *Figure 35, p.147*).

Nous avons remarqué que l'apport alimentaire en ARA augmente l'abondance du genre Escherichia-*Shigella* qui regroupe certaines espèces et souches commensales ainsi que des espèces pathogènes communes à l'homme et la souris (Ledwaba *et al*., 2020). La souche *E. Coli Nissle* a d'ailleurs été utilisée comme bactérie probiotique (Rodríguez-Nogales *et al*., 2018) mais de manière générale, les bactéries du genre *Enterobacteriacea* comme les *E. coli* stimuleraient la réponse inflammatoire colique en cas de dysbiose se traduisant par une augmentation de leur abondance dans le microbiote. L'étude de Cani a montré qu'une augmentation de bactéries *E. Coli* (contenant du LPS dans leurs parois cellulaires) dans l'intestin ou le colon pourrait altérer la barrière intestinale et ainsi libérer du LPS dans la circulation sanguine, déclenchant une inflammation chronique de bas grade (Cani *et al.*, 2007). Leur capacité pro-inflammatoire dépendrait de leurs interactions avec l'hôte et notamment l'induction de l'IL-6 (Qi *et al.*, 2020 ; Kittana *et al.*, 2018). Au sein des études sur les régimes

hyperlipidiques, l'étude menée par Gao sur une administration de 9 semaines chez la souris a notamment montré une inhibition des *Escherichia-Shigella* sans incidence sur les paramètres métaboliques, le profil inflammatoire du colon ou du tissu adipeux (Gao *et al.,* 2020). En revanche, des études plus nombreuses, montrent une augmentation des *Escherichia- Shigella* dans des régimes hyperlipidiques (Kong *et al.,* 2019; Singh *et al.,* 2020).

L'autre résultat intéressant de notre analyse du microbiote fécal et de l'impact des régimes utilisés est une augmentation de l'abondance des *Bifidobacterium pseudolongum* dans le groupe « HL-ARA » qui est supprimée par l'apport d'ARA. Les Bifidobactéries sont des bactéries anaérobies, Gram-positives et saccharolytiques, retrouvées principalement dans le TGI des mammifères, des oiseaux et des insectes (Bottacini *et al.,* 2014). *Bifidobacterium pseudolongum* possède un rôle en tant qu'espèce clé dans le microbiote intestinal, puisqu'elle aide au développement d'autres espèces de *Bifidobacteriaceae* et de *Butyricimonas* lorsqu'elle est administrée par voie orale en addition d'un régime hyperlipidique (60% de lipides). Cette espèce bactérienne est ainsi présentée en tant que bactérie probiotique (Bo *et al.,* 2020; Centanni *et al.,* 2018). Cette bactérie est ainsi connue pour améliorer l'environnement intestinal et favoriser la colonisation de bactéries bénéfiques à l'intestin lorsqu'elle est administrée par voie orale mais aucun article n'a relaté d'effet lorsque ces bactéries se développent grâce à un régime alimentaire (Bo *et al.,* 2020). Dans notre étude, l'enrichissement en lipides de 5 à 15% dans le régime semble favoriser la croissance *Bifidobacterium pseudolongum*. Les FOS (pour rappel : fructooligosaccharides) sont des prébiotiques qui ont été rapportés comme favorisant la croissance des *Bifidobaterium* et particulièrement celle de *Bifidobacterium pseudolongum* (Mao *et al.,* 2018), mais, à notre connaissance, ce type de résultat n'a pas été décrit jusqu'ici pour un apport lipidique chez la souris. En revanche, les données de Bo et ses collaborateurs ont montré que l'utilisation de *Bifidobacterium pseudolongum* en tant que probiotique réduit l'hypertriglycéridémie de souris soumise à un régime hyperlipidique (Bo *et al.,* 2020). Il est possible que l'augmentation de l'abondance de *Bifidobacterium pseudolongum* dans le microbiote fécal des souris soumises au régime « HL-ARA » soit un mécanisme adaptatif à ce régime mais des explorations métaboliques plus approfondies sont sans doute nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

Cependant, l'ajout d'ARA à ce régime modérément hyperlipidique réduit l'abondance de *Bifidobacterium pseudolongum* au même niveau que le groupe de régime « Std-ARA ». Une des hypothèses possibles pour expliquer ce résultat pourrait être que l'ARA possèderait des effets antibactériens vis-à-vis de *Bifidobacterium pseudolongum*. Les effets antimicrobiens et inhibiteurs de croissance bactérienne des AGPIs ont déjà été mis en évidence sur les bactéries

Gram-positives (Das, 2006; Kabara *et al.*, 1972). Peu d'études en revanche se sont intéressées aux effets de l'ARA et quelques-unes font état d'effets antibactériens sur certaines souches bactériennes, mais aucune ne relate les effets de l'ARA sur *Bifidobacterium pseudolongum*.

D'autres travaux ont mis en avant la capacité de l'ARA à déstabiliser *in vitro* les membranes bactériennes par modification des concentrations en potassium (Davis & Silbert, 1974; Wu *et al.*, 2006). Il a également été montré que l'ARA aurait la faculté *in vivo* ou *ex vitro* d'impacter la capacité de phagocytose des macrophages et ainsi d'augmenter la génération de radicaux libres participant à leur activité antimicrobienne. Différentes données ont montré que l'ARA libéré par les lymphocytes après stimulation participe à la production de peroxydes lipidiques, PG, LT et lipoxines qui présentent des effets antimicrobiens (Das, 2018). Il faut rappeler que l'effet que nous observons sur le microbiote fécal a été obtenu avec un apport de triglycérides riches en ARA et suppose donc une libération de l'ARA par la PLA_2 pancréatique. En résumé, d'après les données de la littérature actuelle, cet effet peut être soit directement lié à une activité antibactérienne dirigée spécifiquement contre *Bifidobacterium pseudolongum* de l'ARA libéré dans le tube digestif, soit indirectement lié à une action sur les interactions hôte-microbiote après incorporation de l'ARA dans les cellules immuno-compétentes du tube digestif. Des essais de culture *in vitro* en présence d'ARA pourraient explorer la première hypothèse alors que l'étude de la seconde nécessiterait des investigations plus complexes, comme par exemple sur les eicosanoïdes produits dans le tube digestif et leurs effets chez des souris soumises aux régimes « HL-ARA » et « HL+ARA ».

B. Effets d'un régime modérément hyperlipidique enrichi ou non en ARA sur l'inflammation et la barrière colique

1. Présence d'inflammation précoce dans les fèces et screening de protéines inflammatoires dans le colon

Afin de déterminer la présence d'une inflammation précoce au niveau colique, notre attention s'est en premier lieu portée sur une analyse ELISA d'un marqueur d'inflammation aigue dans les fèces des animaux, la Lcn-2 (voir *Figure 38, p.150*). L'étude de ce marqueur n'a montré aucune différence entre les animaux nourris 0, 9 et 12 semaines entre les trois régimes. En comparaison avec l'étude de Chassaing et collaborateurs, les niveaux de Lcn-2 retrouvés chez nos animaux restent des niveaux assez bas, équivalents des niveaux observés chez leurs animaux contrôles (Chassaing *et al.*, 2012). Les modèles standardisés de colites recourant à

l'utilisation de Lcn-2 sont principalement des modèles de colites induites par du DSS comportant des similitudes avec la colite ulcérative chez l'homme ou encore des modèles de colite spontanée (souris déficientes pour l'IL-10) (Chassaing *et al.,* 2012; Kim *et al.,* 2017). Ces modèles sont des modèles agressifs, et non représentatifs de l'effet d'un régime modérément hyperlipidique sur l'inflammation du colon. A ce titre, il parait normal que ces modèles agressifs montrent des niveaux de Lcn-2 supérieurs à ceux observés dans notre étude. Il est fort probable que les régimes modérément hyperlipidiques ne provoquent pas la même intensité en termes d'effet qu'un modèle de colite induit au DSS. Cette hypothèse peut être appuyée par l'étude de Reichardt et ses collaborateurs qui n'ont observé aucune différence significative entre leurs régimes *Western-Diet* (35% d'apport lipidique en énergie) et contrôle (17% d'apport lipidique en énergie) à 9 et 12 semaines de régime, bien que les niveaux de Lcn-2 soient supérieurs aux nôtres (Reichardt *et al.,* 2017). Une étude générale des marqueurs de l'inflammation a été réalisée dans le but de discriminer plusieurs marqueurs pouvant être étudiés dans notre étude. L'analyse de ces 140 marqueurs au travers du Protéome profiler XL (voir *Figure 39, p.170*) nous a permis de mettre en évidence un certain nombre de marqueurs potentiels que nous avons par la suite étudiés en RT-qPCR.

Cette analyse, outre le fait de nous permettre de discriminer des marqueurs potentiels, peut également être analysée au travers d'une étude bio-informatique. Pour ce faire, l'ensemble des marqueurs après 9 semaines de régimes ont été rentrés dans le site *STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins pathway)* (string-db.org). Ce site internet est une base de données biologiques et une ressource Web d'interactions protéines-protéines connues et prédictive. Il contient des informations provenant de nombreuses sources, y compris des données expérimentales, des méthodes de prédiction computationnelle et des collections publiques de textes. *STRING pathway* sert également à mettre en évidence les enrichissements fonctionnels dans les listes de protéines fournies par les utilisateurs en utilisant un certain nombre de systèmes de classification fonctionnelle tels que GO (*Gene Ontology),* et KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Ce site nous permet donc, via une analyse en « *Multiple proteins* », de recréer des liens entre les différentes protéines et de mettre en évidence leur implication dans un certain nombre de termes GO. Les termes GO appartiennent à un projet de bio-informatique destiné à structurer la description des gènes et produits géniques dans le cadre d'une ontologie commune à toutes les espèces. Ils sont regroupés classiquement selon trois axes :

1- les processus biologiques dans lesquels la protéine ou le gène codant pour la protéine est impliqué(e),

2- les fonctions moléculaires réalisées par la protéine ou le gène codant pour la protéine (par exemple une fonction structurelle ou catalytique),
3- les composants cellulaires dans lesquels la protéine est impliquée (milieu intra ou extracellulaire).

STRING pathway nous permet également de faire ressortir des voies KEGG, mettant en évidence les protéines impliquées dans une même cascade de signalisation. Lorsque les différentes protéines observées dans le protéome profiler après 9 semaines de régime ont été rentrées sur le site *string pathway*, nous avons obtenu la configuration présentée en *figure 50 (p.172)*. Cette figure représente un graphique d'interaction entre les différentes protéines en regroupant plusieurs bases de données issues de sites internet, de livres, de revues ou encore d'articles originaux. STRING pathway a représenté une interaction entre l'IL-1β, l'ICAM-1, l'adiponectine et le CD40 pouvant être de plusieurs types : de la co-expression de protéines (représenté par un lien noir), de l'interaction déterminée expérimentalement (avec un lien rose entre ICAM-1 et l'adiponectine) ou encore en regroupant toutes les ressources écrites précédemment citées (en lien vert).

Cette analyse bio-informatique et la mise en évidence de ces interactions protéines-protéines a conforté notre choix d'étudier les marqueurs de l'IL-1β, de ICAM-1, de l'adiponectine et de CD40. Par ailleurs, le site STRING pathway réalise un tri des différentes protéines impliquées dans des termes GO spécifiques (processus biologiques, fonctions moléculaires et composants cellulaires), donnant précisément le nombre et le nom des protéines impliquées dans chaque termes GO. Afin de mettre en évidence les proportions de protéines impliquées dans les termes GO donnés par STRING pathway, le graphique réalisé en *figure 51 (p.172)* a été effectué. Ce graphique a pour but de révéler l'abondance de protéines spécifiquement impliquées dans un terme GO bien défini et ainsi de mettre en évidence l'impact de ces protéines dans notre étude. Dans un but d'optimisation de l'analyse bio-informatique, seuls les termes GO dans lesquels plus de 50% des protéines révélées par le protéome profiler sont impliquées ont été retenus. Les premiers termes GO ressortant de cette analyse se révèlent être des termes GO impliqués dans la réponse positive à un stimulus et notamment au niveau cellulaire. Cette analyse dans son ensemble nous permet de mieux appréhender l'impact des 9 semaines de régimes sur la présence de ces protéines impliquées dans la réponse inflammatoire et de définir quelques pistes potentielles de recherches supplémentaires ou d'investiguer plus intensément certains axes (réponse au stress par exemple ou régulation de la voie des MAPK).

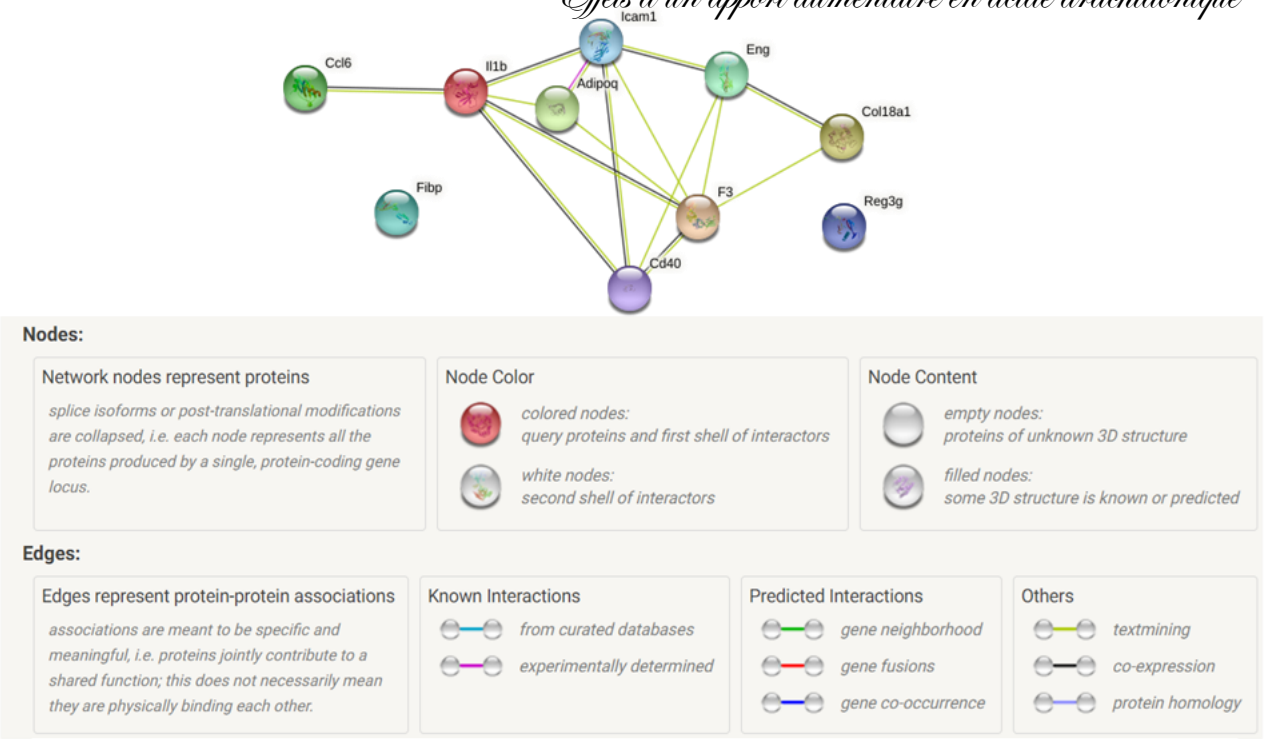
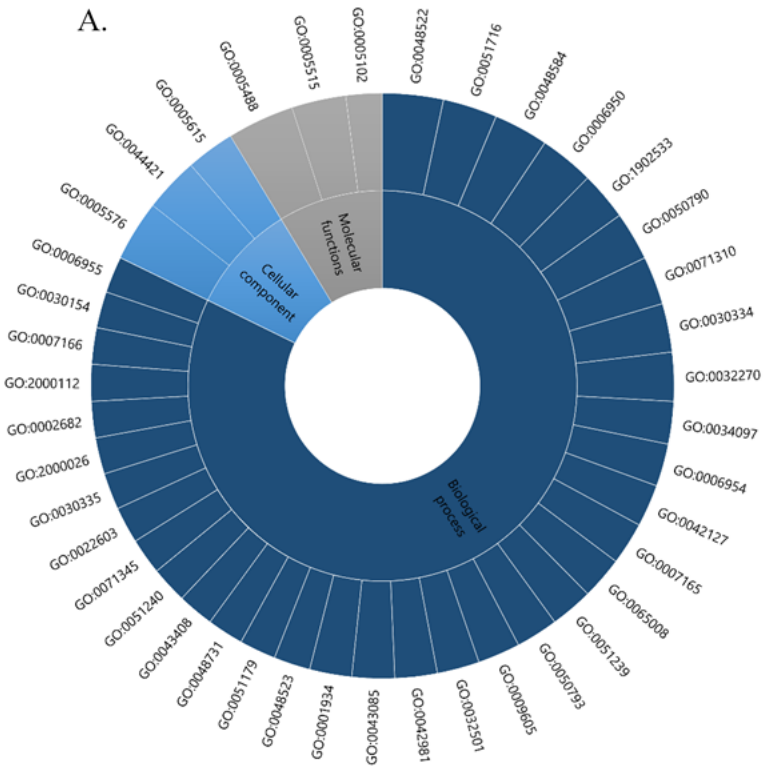


Figure 50 : Représentation graphique par STRING pathway des protéines mises en évidence par le protéome profiler après 9 semaines de régime.

A.



B.

Biological process	GO:0048522	Positive regulation of cellular process
	GO:0051716	Cellular response to stimulus
	GO:0048584	Positive regulation of response to stimulus
	GO:0006950	Response to stress
	GO:1902533	Positive regulation of intracellular signal transduction
	GO:0050790	Regulation of catalytic activity
	GO:0071310	Cellular response to organic substance
	GO:0030334	Regulation of cell migration
	GO:0032270	Positive regulation of cellular protein metabolic process
	GO:0034097	Response to cytokine
	GO:0006954	Inflammatory response
	GO:0042127	Regulation of cell population proliferation
	GO:0007165	Signal transduction
	GO:0065008	Regulation of biological quality
	GO:0051239	Regulation of multicellular organismal process
	GO:0050793	Regulation of developmental process
	GO:0009605	Response to external stimulus
	GO:0032501	Multicellular organismal process
	GO:0042981	Regulation of apoptotic process
	GO:0043085	Positive regulation of catalytic activity
	GO:0001934	Positive regulation of protein phosphorylation
	GO:0048523	Negative regulation of cellular process
	GO:0051179	Localization
	GO:0048731	System development
	GO:0043408	Regulation of MAPK cascade
	GO:0051240	Positive regulation of multicellular organismal process
	GO:0071345	Cellular response to cytokine stimulus
	GO:0022603	Regulation of anatomical structure morphogenesis
	GO:0030335	Positive regulation of cell migration
	GO:2000026	Regulation of multicellular organismal development
	GO:0002682	Regulation of immune system process
	GO:2000112	Regulation of cellular macromolecule biosynthetic proces
	GO:0007166	Cell surface receptor signaling pathway
	GO:0030154	Cell differentiation
	GO:0006955	Immune response
Cellular component	GO:0005576	Extracellular region
	GO:0044421	Extracellular region part
	GO:0005615	Extracellular space
Molecular functions	GO:0005488	Binding
	GO:0005515	Protein binding
	GO:0005102	Signaling receptor binding

Figure 51 : Représentation graphique de la proportion de protéines impliquées dans chaque termes GO donnés par STRING pathway après 9 semaines de régime.

(A) La proportion en protéines impliquées dans chaque termes GO a été quantifiée (ratio de protéines impliquées/le nombre total de protéines révélées par le protéome profiler) afin d'obtenir une représentation graphique de l'enrichissement en protéine dans chaque termes GO. Les termes GO donnés par STRING pathway sont ceux représentant les enrichissements les plus pertinents en protéine (plus de la moitié des protéines révélées par le protéome profiler sont impliquées dans le terme GO). (B) Tableau associant les termes GO avec les fonctions qui leur est associées. Le tableau est divisé suivant les trois axes, processus biologique, composé cellulaire et fonctions moléculaires.

2. Impact des régimes « HL+/-ARA » sur le colon

a. Le régime « HL+ARA » présente une inflammation de bas grade après 9 semaines de régime

Grâce à l'utilisation du protéome profiler et cette analyse bio-informatique, nous avons pu sélectionner différents marqueurs inflammatoires dans le but de compléter les analyses réalisées sur les cytokines inflammatoires IL-1β, IL-6 et le TNF-α dans le colon après 9 et 12 semaines de régime (voir *Figure 40, p.155*).

L'étude des cytokines inflammatoires dans le colon a révélé, après 9 semaines de régime, une augmentation des niveaux d'IL-1β et de TNF-α pour les animaux du groupe « HL+ARA » avec une diminution des niveaux de l'IL-1β et du TNF-α observée entre 9 et 12 semaines pour ce même groupe. Cette diminution s'observe pour le TNF-α entre la semaine 9 et 12 pour le groupe « HL-ARA », ce qui met en avant l'importance de la cinétique dans des études de longue administration de régime. En ce qui concerne les niveaux de cytokines inflammatoires dans le colon, la littérature présente des données controversées dont les niveaux varient d'une étude à l'autre en fonction des compositions des régimes utilisés (Gulhane *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019; Teixeira *et al.*, 2011). Notre étude a permis de mettre en évidence des effets du régime, mais uniquement lorsque le régime modérément hyperlipidique contient un apport d'ARA. L'absence d'inflammation notable dans le colon de souris nourries avec le régime « HL-ARA » peut être expliquée par la présence de *Bifidobacterium pseudolongum* (considérée comme bactérie bénéfique au TGI) et l'absence conjointe de *Escherichia-Shigella*.

Par ailleurs, une agmentation des niveaux de CD40 et d'adiponectine (voir *Figure 41, p.156*) après 9 semaines est observée chez le groupe « HL+ARA », contrairement aux résultats montrés par le protéome profiler. Il est difficile de comparer les résultats observés par les techniques d'hybridation sur membrane du protéome profiler et ceux obtenus par RT-qPCR. D'une part car la première repose sur l'expression protéique et la seconde sur l'expression génique et d'autre part car la technique du protéome profiler est sensible à la manipulation de l'expérimentateur (un groupe par membrane, incubation et révélations séparées etc…). De plus, il est important de rappeler que le protéome profiler a été réalisé sur un *pool* d'homogénats regroupant plusieurs tissus de colon d'un même groupe ce qui diminue la sensibilité et ne reflète pas les variations inter-individuelles, contrairement à la RT-qPCR. Afin d'assurer la validité et la transférabilité de ces résultats, il serait donc judicieux de réitérer l'analyse avec de nouvelles membranes de protéome profiler sur chacun des groupes après 9 semaines de régime mais cela suppose un coût financier conséquent. En outre, le protéome profiler n'est qu'une approche de

screening destinée à identifier des marqueurs potentiellement intéressants (c'est un test de *early-stage discovery research)* qui doit être couplé à des techniques plus ciblées et sélectives comme l'expression génique et/ou protéique ou encore la quantification de marqueurs par colorimétrie ou par l'intermédiaire d'anticorps. Ainsi uniquement les résultats des RT-qPCR seront discutés dans cette partie et sont pris en compte dans l'élaboration de nos conclusions.

Nous avons observé une augmentation de l'expression génique par RT-qPCR de CD40 et d'adiponectine dans le colon suite à 9 semaines de régime « HL+ARA » en comparaison avec les 2 autres régimes (voir *Figure 41, p.156*). Le récepteur CD40 est exprimé de façon constitutive dans les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques. L'interaction de CD40 avec son ligand est à l'origine d'un signal d'activation qui induit des fonctions effectrices (régulation de l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales, production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules présentatrices d'antigènes, différenciation cellulaire B). L'expression de CD40 et de l'adiponectine est corrélée avec l'inflammation dans le tissu adipeux lors d'administration de régimes hyperlipidiques (Guo *et al.,* 2013; Liu *et al.,* 2019) mais elle reste peu documentée dans le tissu intestinal. L'expression plus importante de CD40 est associée avec une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1β et le TNF-α (Antoniades *et al.,* 2009; Guo *et al.,* 2013). Ce résultat de CD40 est tout de même à modérer car une plus forte présence de ce récepteur n'est pas forcément représentative d'une plus forte liaison avec son ligand, ce qui suggère de réaliser une étude sur l'expression du ligand de CD40 et son interaction avec le récepteur.

Concernant l'adiponectine, son rôle pro- ou anti-inflammatoire est débattu dans la littérature mais plusieurs études relatent tout de même une corrélation négative entre les niveaux d'adiponectine et ceux de l'IL-6 (Choi *et al.,* 2007; Engeli *et al.,* 2003; Krakoff *et al.,* 2003). En revanche, aucune corrélation n'a pu être faite concernant les taux d'adiponectine plasmatique et les niveaux d'IL-1β et TNF-α chez l'Homme. Il a été montré qu'un traitement au TNF-α supprimait l'expression de l'adiponectine dans les adipocytes 3T3-L1 *in vitro,* à l'instar de l'IL-6 (Fasshauer *et al.,* 2003). L'équipe de Zhuang, qui a réalisé une étude comparative entre un régime hyperlipidique sans ARA et un régime hyperlipidique supplémenté en ARA, n'a montré aucune différence des niveaux d'adiponectine dans le sérum, contrairement à une augmentation des niveaux d'IL-6 et de TNF-α chez les souris mâles (et non les femelles) soumises à l'apport d'ARA (Zhuang *et al.,* 2017).

Aux vues de ces premiers constats, il est possible néanmoins d'indiquer qu'une alimentation modérément hyperlipidique et supplémentée en ARA à hauteur de 1% provoque une inflammation de bas grade au niveau intestinal. D'après les informations rapportées plus

haut sur les résultats du microbiote fécal, il est possible de poser l'hypothèse que cette inflammation de bas grade puisse être liée directement ou indirectement, outre le régime alimentaire en lui-même, à la dysbiose intestinale observée dans le groupe « HL+ARA » comparé à son homologue non supplémenté. En effet, les souris nourries avec le régime « HL-ARA » durant 9 semaines ne montrent aucun signe d'inflammation de bas grade, bien que le régime soit modérément hyperlipidique. Il est possible que cette absence d'effet du régime soit en partie due à la présence de *Bifidobacterium pseudolongum* et l'absence de *Escherichia-Shigella*.

Nous avons également observé une baisse des niveaux d'ARNm entre les animaux nourris 9 semaines et ceux nourris 12 semaines, traduisant l'importance de réaliser une cinétique inflammatoire afin de déterminer la fenêtre d'administration la plus appropriée. A ce titre, Guillemot et ses collaborateurs ont réalisé une étude comparative en 2016 durant laquelle il confronte les résultats d'animaux nourris durant 1, 2, 3, 6, 8 ou 16 semaines avec un régime standard (10% de lipides en énergie) ou un régime hyperlipidique (45% de lipides en énergie). Leurs résultats démontrent l'importance de la fenêtre d'administration lorsque l'on travaille dans l'alimentation car une inflammation peut être observée dans certain tissus à 6 semaines et disparaitre à 8 semaines (Guillemot-Legris *et al.*, 2016).

b. Les régimes « HL+/-ARA » induisent une modification de la barrière colique

Les jonctions serrées sont des structures clés entre les cellules intestinales (entérocytes) permettant d'assurer l'étanchéité de la barrière intestinale (Ménard *et al.*, 2010). L'intégrité des jonctions serrées est régulée dynamiquement par l'arrangement spatial de l'actine et l'interaction entre les protéines transmembranaires intégrales et périphériques. Les quatre protéines transmembranaires intégrales sont l'occludine, les claudines, les molécules d'adhésion jonctionnelles (JAM) et la tricelluline. Les ZO-1, ZO-2, et ZO-3 sont des protéines cytoplasmiques qui agissent quant à elles comme des ponts permettant de relier les protéines transmembranaires au cytosquelette d'actine. Les niveaux de phosphorylation, de distribution et d'expression des protéines des jonctions serrées jouent un rôle critique dans la régulation des fonctions de la barrière mise en place par les jonctions serrées.

L'occludine est fortement exprimée au niveau des contacts cellule-cellule et est considérée comme importante dans l'assemblage et la maintenance des jonctions serrées. La phosphorylation de l'occludine est corrélée avec la régulation de sa localisation et sa fonction. L'occludine qui est phosphorylée au niveau de ses résidus sérine/thréonine est localisée

principalement dans la membrane cellulaire et beaucoup moins dans le cytoplasme. De plus, la phosphorylation de l'occludine semble contrôler son interaction avec d'autres protéines des jonctions serrées telles que ZO-1 (Rao, 2009). L'interaction entre l'occludine et ZO-1 est essentielle pour l'intégrité de la jonctions serrée (Bazzoni & Dejana, 2004).

Bien qu'il n'y ait pas d'homologie de séquence entre l'occludine et les claudines, la famille des claudines se compose également de quatre domaines transmembranaires et de deux boucles extracellulaires qui participent à la fabrication des jonctions serrées. Les boucles extracellulaires de la claudine facilitent les interactions hétérophiles et hémophiles avec les cellules adjacentes, qui génèrent des barrières ou des pores pour le passage de molécules sélectives dans les voies paracellulaires (Lee, 2015; Van Itallie & Anderson, 2006). Bien que d'autres études soient nécessaires pour déterminer les fonctions exactes des claudines dans les jonctions serrées, des études *in vivo* en ont quand même souligné l'importance (Furuse *et al.*, 2002; Tamura *et al.*, 2011). Les souris déficientes en Claudine-1 présentaient une formation anormale des jonctions serrées de l'épiderme, facilitant le développement d'un cancer et des métastases (Furuse *et al.*, 2002).

D'après les résultats observés après 9 semaines de régime par RT-qPCR (voir *Figure 42, p.158*), nous avons mis en évidence une augmentation des niveaux de claudine 1 dans le colon des souris nourries avec les régimes modérément hyperlipidiques comparés au régime « Std-ARA », avec également une augmentation de l'occludine pour les animaux nourris avec le régime « HL+ARA ». Après 12 semaines de régime, les souris nourries avec le régime « HL-ARA » se caractérisent par une augmentation de la claudine 1, tandis que les animaux du groupe « HL+ARA » montrent eux, un retour des niveaux de claudine 1 et occludine équivalents au groupe « Std-ARA ».

La plupart des articles rencontrés dans la littérature relatent une diminution des niveaux d'expression des claudine 1 et 2 ainsi que de l'occludine, ce qui traduit une altération de la barrière intestinale ou colique et une augmentation de la perméabilité (Bahlouli *et al.*, 2020; Gulhane *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2012). L'étude menée par Benoit et ses collaborateurs sur des régimes modérément hyperlipidiques et fortement hyperlipidiques n'a montré aucune différence en termes de niveaux d'occludine dans le colon des souris mais a révélé une diminution de la phosphorylation de l'occludine chez les animaux nourris avec un régime modérément hyperlipidique (Benoit *et al.*, 2015), ce qui souligne l'importance de la phosphorylation de l'occludine dans son rôle de maintien de la barrière colique. Une expérimentation qui serait intéressante dans le cadre notre étude afin de compléter au mieux nos résultats.

Au sein de notre étude, nous ne pouvons pas conclure à une modification de perméabilité de la barrière colique qui entrainerait un passage de composants bactériens propres à créer une inflammation systémique. Cependant, nous avons remarqué des modifications d'expressions des protéines des jonctions serrées qui montrent une réactivité de la barrière intestinale. L'adressage des constituants des jonctions serrées à la membrane semble être un élément de recherche complémentaire important. Par ailleurs, de nombreux auteurs ont réalisé une étude de perméabilité à l'aide d'un marqueur fluorescent au travers de la barrière colique afin d'investiguer d'avantage la possible altération de perméabilité. L'utilisation notamment de FITC-dextran (Fluorescein isothiocyanate) permet via un gavage de l'animal puis dosage de la fluorescence dans le sang, d'observer un passage plus ou moins important au travers de la barrière colique représentatif d'une altération de la perméabilité (Condette *et al.,* 2014; Yang *et al.,* 2018). Cette approche serait intéressante à réaliser dans le but de compléter nos résultats.

Par ailleurs, le groupe « HL+ARA » présente une augmentation après 12 semaines de régime des niveaux de ICAM-1 par RT-qPCR (voir *Figure 42, p.158*), potentiellement visible après 9 semaines si la grande variabilité inter-individuelle rencontrée avait été moins forte. Peu d'études à notre connaissance relatent du profil d'expression de ICAM-1 lors d'une inflammation dans le colon. Une étude réalisée par Forbes et ses collaborateurs a montré que ICAM-1 se trouvait augmenté lors d'inflammation éosinophile. En effet, ICAM-1 facilitait la migration des éosinophiles puisqu'ils expriment les ligands de ICAM-1 (LFA-1 et MAC-1) (Forbes *et al.,* 2006). Par ailleurs, Vainer a réalisé une étude sur des tissus de patients atteints de la maladie de Crohn et de colites ulcéreuses et a montré que ICAM-1 était régulée à la hausse dans les zones d'infiltration lymphocytaire denses et près des abcès et des ulcérations de la crypte du colon. Les auteurs ont également remarqué que les ulcérations étaient couvertes par une couche continue de macrophages et de cellules épithéliales exprimant ICAM-1 (Vainer *et al.,* 2006). Dans leur étude, Mori et ses collaborateurs ont rapporté une augmentation de ICAM-1 dans le colon en présence de LPS (Mori *et al.,* 1999). Toutes ces données laissent à penser que la présence de ICAM-1 dans le colon des animaux nourris 12 semaines avec le régime « HL+ARA » relate d'une activation de la muqueuse colique susceptible d'induire la transmigration de cellules immunitaires et par conséquent, une possible modification de la perméabilité de la barrière colique.

3. Impact des régimes « HL+/-ARA » au niveau systémique

a. Le foie

Au sein de notre étude, l'analyse des niveaux inflammatoires par RT-qPCR dans le foie (voir *Figure 43, p.159*) après 9 semaines de régime n'a montré aucune différence entre les groupes, principalement en raison d'une grande variabilité inter-individuelle. En revanche, après 12 semaines de régime, une augmentation des niveaux d'IL-6 a été observée dans le groupe « HL-ARA ». Il est pourtant difficile de conclure à une inflammation dans le foie d'animaux nourris 12 semaines avec le régime « HL-ARA » car aucune augmentation de l'IL-1β et du TNF-α n'a été observée.

Ceci pose la question de l'interprétation de cette augmentation de l'IL-6 en raison de son rôle pro- et anti-inflammatoire comme précédemment décrit dans ce manuscrit (voie classique et la trans-signalisation). Dans cet organe, l'IL-6 joue un rôle important dans la régénération hépatique, qui est suggéré à la suite des mesures élevées des taux d'IL-6 après hépatectomie partielle (Trautwein *et al.,* 1996). En complément de cette suggestion, les souris IL-6$^{-/-}$ ont montré une altération de la régénération hépatique après une hépatectomie des deux tiers (Cressman *et al.,* 1996). Des expériences avec des souris transgéniques IL-6 et des souris doublement transgéniques IL-6/sIL-6R ont démontré que seule la combinaison d'IL-6 et du récepteur circulant de l'IL-6 (le sIL-6R) conduit à une prolifération hépatocellulaire efficace, suggérant un rôle décisif de la trans-signalisation de l'IL-6 dans la régulation de la régénération hépatique (Peters *et al.,* 1996 & 1997). Il est donc difficile à ce stade de conclure quant à une inflammation du foie pour les souris nourries avec le régime « HL-ARA » même si, complétés par les résultats du colon et du tissu adipeux, il est possible de le suspecter.

En ce qui concerne les niveaux de TNF-α, une différence entre les animaux nourris 9 et 12 semaines avec le régime « HL+ARA » a été mise en évidence. La plupart des articles à notre connaissance travaillant sur des régimes hyperlipidiques montrent des niveaux de cytokines pro-inflammatoires de l'ordre de 2 à 5 fois plus importants lorsque les animaux sont nourris avec un régime hyperlipidique (van der Heijden *et al.,* 2015a; Liu *et al.,* 2016; Zhuang *et al.,* 2017). Zhuang et ses collaborateurs ont ainsi conclut que la supplémentation en ARA dans un régime hyperlipidique (45% de lipides en énergie) augmente les niveaux de TNF-α et d'IL-6 en comparaison à un régime hyperlipidique non supplémenté. La supplémentation en ARA dans leur protocole induit de fortes répercussions sur l'inflammation engendrée par le régime hyperlipidique chez les souris mâles et non les femelles. Il est tout de même important de noter

que l'étude de Zhuang administre leur régime hyperlipidique sans ARA sur 10 semaines avant d'inclure l'enrichissement en ARA durant 15 semaines. Le fait d'induire l'obésité chez leurs animaux puis d'avoir recours à un temps d'administration plus long des régimes supplémentés ou non en ARA pourrait expliquer les différences des résultats de l'étude de Zhuang avec les nôtres pour le profil cytokinique.

Il est intéressant de relever une différence de cinétique inflammatoire de bas grade entre le colon (avec des différences inter-groupes plus importantes après 9 semaines de régime) et le foie (où les différences inter-groupes sont plus importantes après 12 semaines), bien qu'encore une fois, une grande variabilité ne permette de conclure quant à des différences inter-groupes pour certaines cytokines. Dans cette continuité, l'étude de Van der Heijden a souligné l'importance de ce phénomène en incluant la présence de cytokines inflammatoires dans différents organes dont le foie (van der Heijden *et al.*, 2015a). Ces auteurs ont administré un régime hyperlipidique sur des périodes de 24, 40 ou 52 semaines et rapportent une augmentation du TNF- et de l'IL-1β en particulier après 40 semaines de régime (les niveaux stagnants entre 40 et 52 semaines d'administration). Ceci démontre bien l'importance de la durée d'administration des régimes alimentaires. Il est possible qu'une administration prolongée puisse induire des réponses inflammatoires plus franches. Néanmoins, il faut nuancer car il s'agit dans le cas d'utilisation de régimes alimentaires, de sub-inflammation et non de niveaux de réponse inflammatoires obtenus lors d'administration de substances pathogènes. De plus, réaliser des études sur 40 ou 52 semaines se relève complexe dans les conditions actuelles de l'expérimentation animale et pose le problème du vieillissement des animaux qui est un facteur à l'origine de variation des réponses inflammatoires, ce qui limite les comparaisons avec notre propre étude.

b. Le tissu adipeux

Nos résultats montrent des modifications très importantes des niveaux d'expression de l'IL-6 et du TNF-α par RT-qPCR dans le tissu adipeux mésentérique dans les groupes des souris « HL-ARA » et « HL+ARA » à 9 et 12 semaines de régime (voir *Figure 44, p.160*). Les résultats de l'IL-1β ne révèlent aucune différence statistique exploitable pour notre discussion, en raison principalement en l'état en raison d'une grande variabilité inter-individuelle. Il n'est pas courant à notre connaissance, d'observer de telles augmentations de l'IL-6 dans le tissu adipeux mésentérique lors d'une administration de régime modérément hyperlipidique ou hyperlipidique, avec ou sans supplémentation en ARA (He *et al.*, 2020; van der Heijden *et al.*,

2015a; Poret *et al.,* 2018; Zhuang *et al.,* 2017). De nombreuses études confirment des niveaux élevés de TNF-α chez des souris nourries avec un régime riche en lipides qu'il soit supplémenté ou non comme le montrent celles de Zhuang et de van der Heijden (van der Heijden *et al.,* 2015b; Zhuang *et al.,* 2017). Nos résultats sont globalement en faveur de la création d'un état inflammatoire dans le tissu mésentérique par un apport lipidique modéré, riche en précurseur ω-6. La contribution spécifique de l'ARA est en revanche difficile à caractériser aux vues des résultats obtenus par le groupe « HL-ARA » (et également par les différences inter-individuelles), qui met en avant l'importance d'un régime modérément hyperlipidique dans la mise en place de réponse inflammatoire.

Dans le tissu adipeux épididymaire, les variations des niveaux d'expression des cytokines pro-inflammatoires observés par RT-qPCR sont très faibles (voir *Figure 45, p.161*). Ces données ne sont pas en adéquation avec les résultats rencontrés dans la littérature, qui montrent des augmentations de niveaux de cytokines inflammatoires (Poret *et al.,* 2018). Même si notre étude n'utilise pas les mêmes animaux que ceux de l'étude de Poret et ses collaborateurs (des rats mâles prédisposés à l'obésité *versus* résistants à l'obésité), il est tout de même observé une baisse des niveaux de TNF-α. Une étude menée par Caesar en 2010 a montré que le tissu adipeux épididymaire présentait certaines particularités, le tissu pouvant même être divisé en sous-sections (comme le foie multi-lobé) avec un profil d'expression cytokinique différent. Pour donner suite à cette distinction, les auteurs ont conclu que le tissu adipeux épididymaire de souris nourries avec un régime hyperlipidique (24% de lipides en poids de nourriture) se caractérisait par une diminution de la lipogenèse ainsi qu'une diminution des niveaux AGPIs stockés (particulièrement d'ARA) (Caesar *et al.,* 2010). A l'heure actuelle, aucun consensus ne peut être apportée quant aux résultats du tissu adipeux épididymaire aux vues du faible nombre d'études réalisées à ce sujet. Toutefois, l'étude menée par Caesar suggère que la baisse des niveaux de TNF-α constatée dans notre étude proviendrait d'une diminution de la présence des AGPIs dans le tissu adipeux épididymaire engendrée par un régime modérément hyperlipidique.

4. Impact des régimes « HL+/-ARA » au niveau cérébral

Dans le but d'avoir une analyse plus approfondie des effets des régimes modérément hyperlipidiques enrichis ou non en ARA dans le cerveau, nous avons mené une étude exploratoire des cytokines inflammatoires dans le cerveau par RT-qPCR (voir *Figure 47, p.163*)

et avons également analysé la présence de GFAP et d'Iba1 dans le cortex et les hippocampes de souris nourries avec ces régimes durant 9 semaines par Western-Blot (voir *Figure 48, p.164*). Ces données ont révélé une augmentation de la GFAP dans le cortex et les hippocampes du groupe « HL+ARA » ainsi qu'une augmentation de Iba1 dans le cortex des souris nourries avec le régime « HL-ARA ». L'ensemble de ces résultats peuvent être représentatifs d'une augmentation de la présence astrocytes dans le cortex et les hippocampes des souris nourries durant 9 semaines avec le régime « HL+ARA ». Par ailleurs, les animaux du groupe « HL-ARA » présentent une hausse de la présence de cellules microgliales dans les hippocampes après 9 semaines de régime. Afin d'avoir une représentation visuelle de ces résultats, et ce à titre indicatif, nous avons fait le choix de réaliser des études immunohistochimiques avec des marqueurs anti-GFAP sur coupe de tissu cérébral (voir *Figure 49, p.165*). Ceci a montré une augmentation visuelle de la GFAP dans les groupes de régimes modérément hyperlipidiques dans le cortex des animaux.

L'étude par RT-qPCR des cytokines inflammatoires sur cerveau entier a montré de manière générale une diminution des niveaux d'IL-6, d'IL-12 et de CD40 pour les groupes de régime « HL+/-ARA » qui ne suit pas le même profil que l'analyse de la présence de GFAP dans le cortex et hippocampes montrant une augmentation dans le régime « HL+ARA ». Bien que cette analyse montre de faibles variations inter-individuelles, ces résultats nécessitent d'être confortés par des mesures complémentaires car ils ont été réalisés sur deux animaux par groupe et il serait nécessaire de réitérer ces analyses sur un nombre plus important d'animaux. Des études réalisées sur les effets d'administration de régimes hyperlipidiques au niveau cérébral montrent pour la plupart une augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNF-α (Cavaliere *et al.,* 2019; Guillemot-Legris *et al.,* 2016; van der Heijden *et al.,* 2015a) mais toujours dans des structures spécifiques (cortex, hippocampes, cervelet, hypothalamus, amygdales) et non dans l'ensemble du cerveau. Par ailleurs, les durées d'administration des régimes et la composition des régimes diffèrent d'un protocole à l'autre. Il est donc difficile de comparer avec exactitude les résultats de ces études et la nôtre mais cela peut tout de même nous permettre d'anticiper les résultats que nous devions observer. Néanmoins, il en ressort de l'étude menée par Guillemot, que la durée d'administration se révèle être cruciale en termes d'inflammation. En effet, bien que des effets du régime hyperlipidique (60% de lipides en énergie) soient observés après 4 semaines d'administration dans le cortex des souris (notamment augmentation des niveaux de TNF-α), après 6, 8 et même 16 semaines, plus aucune différence n'est observée entre l'ensemble des groupes expérimentaux (Guillemot-

Legris *et al.*, 2016) ce qui suggère par exemple un effet plateau ou encore un rôle anti-inflammatoire des cellules gliales.

L'équipe de Guillemot s'est aussi intéressée à l'étude de la GFAP dans le cortex et le cervelet de souris nourries avec le régime hyperlipidique durant 16 semaines. Après analyse des niveaux d'expression d'ARNm et protéiques, ils ont montré une augmentation de la GFAP dans le cervelet et non dans le cortex des souris (Guillemot-Legris *et al.*, 2016), corrélée avec des niveaux plus importants dans le cervelet de l'IL-1β et du TNF-α montrant l'importance de la présence conjointe de cellules et de cytokines pour qualifier une neuroinflammation comme telle. A ce stade, nous ne pouvons pas faire cela dans notre étude car nous n'avons pas observé d'augmentation conjointe de marqueurs microgliaux, astrocytaires et cytokiniques dans des structures cérébrales spécifiques.

Pour finir, nous avons réalisé au sein de notre travail une étude de perméabilité de la BHE au travers du passage d'un fluorochrome du compartiment périphérique vers le compartiment central. Ceci nous permettait de mettre en évidence une éventuelle altération de la perméabilité de BHE. Ces résultats n'ont pas mis en évidence un passage plus important du fluorochrome du sang vers le cerveau entre nos différents groupes après 12 semaines de régime. Très peu d'études à notre connaissance ont relaté des effets d'un régime riche en lipides sur l'intégrité et la perméabilité de la BHE. Cependant, un protocole expérimental réalisé *in vitro* par Dalvi et ses collaborateurs en 2015 a montré que l'incubation de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux humains en présence d'ARA provoquait une augmentation rapide de la perméabilité de la monocouche de ces cellules, sans doute médiée par la prostaglandine E2 (Dalvi *et al.*, 2015). La différence de résultats avec notre étude pourrait venir de notre paradigme d'approche expérimentale *in vivo* dans notre cas *versus in vitro* dans le cas de l'étude de Dalvi.

C. Conclusion

En conclusion, cette première partie de ce travail de thèse a contribué à approfondir nos connaissances de l'axe microbiote-intestin-cerveau au travers de l'administration d'un régime modérément hyperlipidique supplémenté en ARA. D'après les conclusions de l'étude de Thomas et ses collaborateurs, un régime enrichi en ARA potentialise les troubles de l'apprentissage et de la mémoire à long terme lors d'injection ICV d'oligomères de peptides Aβ (Thomas *et al.*, 2017). Les auteurs ont également mis en évidence une augmentation du marqueur astrocytaire GFAP dans les hippocampes des souris nourries 12 semaines avec le

régime enrichi en ARA, ce qui a conduit à suspecter l'ARA comme facteur de sensibilité aux peptides Aβ, un mécanisme potentiellement véhiculé par des processus inflammatoires et/ou neuroinflammatoires. Basé sur ce postulat de départ, nous avons mis en place différent protocoles expérimentaux afin de mettre en évidence une modulation du microbiote fécal par une alimentation, ainsi que la présence de processus inflammatoires systémique et central.

Nos résultats (schématisés en *Figure 52, p. 185*) ont révélé que l'administration d'un régime modérément hyperlipidique (groupe « HL-ARA ») pendant 9 semaines modifie la diversité du microbiote fécal, avec notamment l'apparition de l'espèce *Bifidobacterium pseudolongum* et la disparition du genre *Escherichia-Shigella*. Cependant, nous avons pu constater que la supplémentation en ARA contrebalance cette observation (groupe « HL+ARA ») et s'accompagne de l'installation d'une inflammation colique de bas grade avec l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires, d'adiponectine et de CD40. Plus précisément, cette inflammation de bas grade se retrouve uniquement dans le colon au cours de la 9ème semaine de régime (*Figure 52, p.185*). Ce processus inflammatoire localisé dans le colon est associé avec une augmentation de l'expression protéique de la GFAP dans le cortex et les hippocampes. Cependant, ces résultats obtenus sur le tissu cérébral doivent être confortés car aucune augmentation des niveaux de cytokines inflammatoires n'a été observée à 9 semaine de régime (*Figure 52, p.185*). C'est pourquoi mener des explorations complémentaires se révèlent nécessaires afin de confirmer, ou d'infirmer, un lien potentiel entre neuroinflammation et consommation d'ARA.

Les résultats obtenus après 12 semaines de régime (schématisés en *Figure 53, p.185*), fenêtre d'administration étudiée dans l'article de Thomas et collaborateurs (Thomas *et al.*, 2017), montrent un effet des régimes sur la globalité de l'organisme sans qu'il n'y ait de réponse localisée à un organe spécifiquement. Au niveau du tissu colique, on observe une augmentation de l'expression génique de ICAM-1, un marqueur d'activation cellulaire impliqué dans la transmigration des cellules immunitaires. En ce qui concerne l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires, elle a été observée du colon vers le foie et le tissu adipeux (*Figure 53, p.185*). Bien qu'encourageants, ces résultats nécessitent d'être confortés afin d'apporter une réponse claire en ce qui concerne l'analyse à 12 semaines, notamment l'analyse du microbiote fécal et l'étude de la neuroinflammation, mais ces résultats semblent prometteurs et renforcent l'hypothèse de l'inflammation comme possible lien de consommation d'ARA et de la survenue et le développement de la MA.

En conclusion de ces données, il est maintenant possible de suspecter que la sensibilité aux peptides Aβ observée dans l'étude de Thomas et ses collaborateurs puisse être induite via

l'axe microbiote-intestin-cerveau, médié potentiellement par la voie inflammatoire, mais nos conclusions demeurent insuffisantes pour pouvoir écarter avec certitude d'autres mécanismes.

Afin d'apporter plus de profondeur à nos données, la prochaine étape de ce projet financé par l'Association France Alzheimer, serait de tester l'administration de probiotiques aux propriétés anti-inflammatoires sur l'axe microbiote-intestin-cerveau comme outil de prévention. Le chapitre suivant s'inscrit dans les prémices de cette perspective et commence par l'optimisation d'un moyen d'administration innovant des bactéries lactiques probiotiques. Afin de caractériser au mieux ce nouveau moyen d'administration, notre protocole expérimental a inclus la mise au point d'un modèle murin de vieillissement accéléré par administration de D-galactose, dont les effets seraient plus en accord avec la physiopathologie de la MA en comparaison avec les modèles d'injection unique ICV de peptides Aβ.

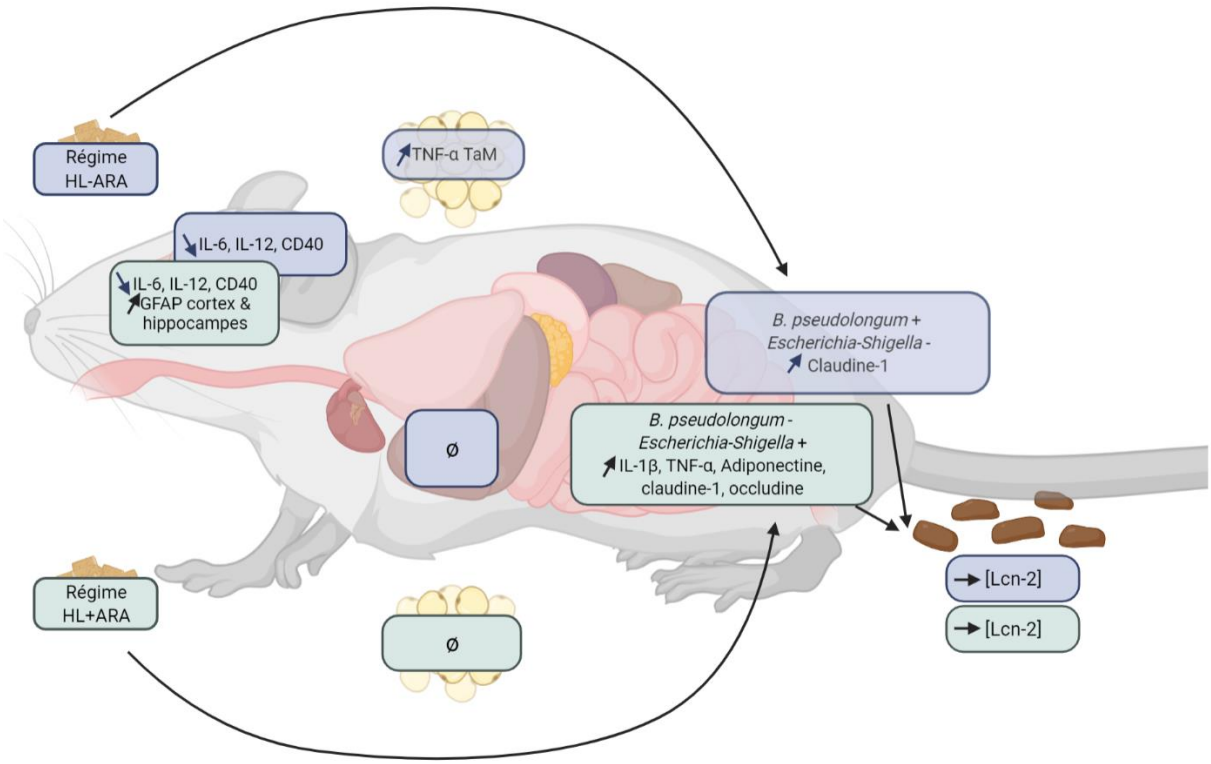


Figure 52 : Récapitulatif des effets observés après une administration de 9 semaines des régimes « HL+/-ARA ».

Ø, aucune modification ; TaM, tissu adipeux mésentérique ; +, présence et -, absence ; Lcn-2, lipocaline-2. Figure réalisée avec BioRender.

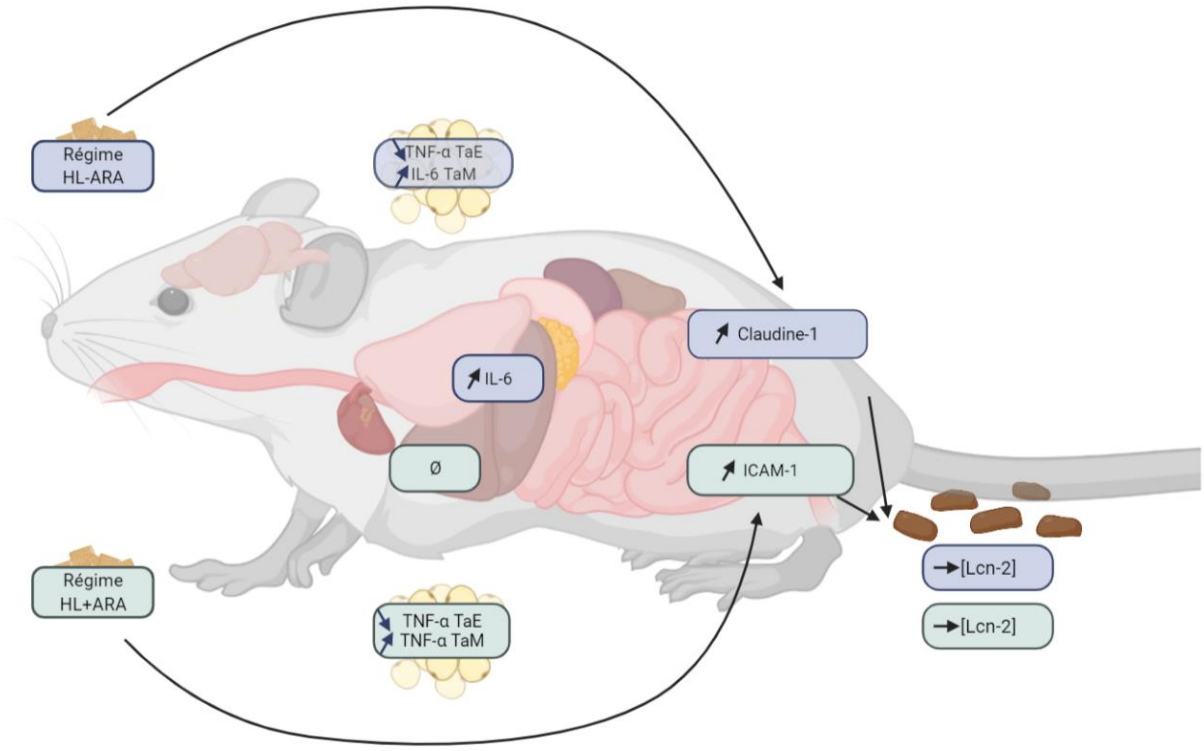


Figure 53 : Résultats récapitulatifs des effets observés après une administration de 12 semaines des régimes « HL+/-ARA ».

Ø, aucune modification ; TaE, tissu adipeux épididymaire ; TaM, tissu adipeux mésentérique ; +, présence et -, absence ; Lcn-2, lipocaline-2. Figure réalisée avec BioRender.

Chapitre 5 : Etude préparatoire de l'analyse du potentiel de souches probiotiques à limiter l'inflammation et la neurodégénération.

"La recherche comporte et comportera toujours une part importante d'activité créatrice."

Pierre Joliot-Curie, Biologiste

I. Introduction

Lors du chapitre précédent, nous avons démontré que l'administration d'un régime modérément hyperlipidique supplémenté en ARA (groupe murin « HL+ARA ») durant 9 semaines induisait une altération du microbiote fécal ainsi qu'une inflammation de bas grade dans le colon, avec des répercussions aux autres organes. Nos conclusions, couplées avec les données de l'étude de Thomas et ses collaborateurs, avancent les mécanismes inflammatoires comme une voie potentielle conduisant à la susceptibilité de la MA, sans pour autant écarter d'autres voies de l'axe microbiote-intestin-cerveau (Thomas *et al.*, 2017). Afin d'apporter plus de profondeur à nos données, la prochaine étape de ce projet serait d'utiliser l'administration de probiotiques et d'évaluer leurs effets sur l'axe microbiote-intestin-cerveau comme outil de prévention. Les probiotiques sont définis par la FAO (*Food and Agriculture Organisation of the United Nations*) et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) comme étant « des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates produisent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte ».

Dans ce travail de thèse, nous avons fait le choix d'avoir recours à des souches de bactéries probiotiques *Streptococcus thermophilus* qui, outre leur capacité à hydrolyser le lactose *in vivo* via l'expression de sa β-galactosidase (Mater *et al.*, 2006), peuvent produire *in vitro* des substances potentiellement bénéfiques pour le compartiment gastro-intestinal. Parmi ces différentes molécules actives, on retrouve principalement des bactériocines comme les thermophilines, qui sont des peptides antimicrobiens inhibiteurs de la croissance de certaines bactéries ou pathogènes telles que *Listeria monocytogenes* (Fontaine & Hols, 2008; Marciset *et al.*, 1997). De précédentes recherches effectuées par Miclo et ses collaborateurs ont aussi montré que la protéase pariétale de *Streptococcus thermophilus* est capable de générer des peptides bioactifs (des peptides conçus à partir d'hydrolyse de protéines de lait) comme des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I obtenus à partir des caséines bovines (Miclo *et al.*, 2012). Plus récemment une fraction peptidique présentant *in vitro* des propriétés anti-inflammatoires a été obtenue par l'intermédiaire du système protéolytique de *Streptococcus thermophilus*, capable de moduler la sécrétion de cytokines inflammatoires. Ces propriétés ont été confirmées par des études *in vitro* menées sur des cellules mononuclées de sang périphérique en culture avec cette bactérie (Junjua *et al.*, 2016; Kekkonen *et al.*, 2008). En complément, des études précliniques menées sur des souris BALB/c ont confirmé les propriétés de protection de *Streptococcus thermophilus* contre des cas de gastrites grâce à la

production d'exopolysaccharides (Rodríguez *et al.*, 2009), tout en préservant la couche du mucus intestinal et en évitant les lésions gastriques à travers la modulation de la réponse immunitaire (Rodríguez *et al.*, 2010).

En complément de la souche *Streptococcus thermophilus*, nous avons également choisi d'utiliser une souche de *Lactobacillus*, dont certaines espèces sont présentes naturellement dans l'intestin, et capables de métaboliser l'AL (pour rappel : acide linoléique) en différents isomères d'ALs conjugués (AGs alimentaires, dérivé de l'AL). Les doubles liaisons de ces ALs sont dites conjuguées car elles sont séparées par une simple liaison carbone-carbone (=C-C=), à la place d'une liaison malonique (=C-C-C=) présente dans l'AL. Ce groupe d'AGs est présent dans notre alimentation au travers de la viande de ruminants, dans certains produits laitiers (Huang *et al.*, 2008), généré au cours de la cuisson (Ha *et al.*, 1987) ou tout naturellement synthétisé sous l'action du microbiote intestinal (Chin *et al.*, 1994). Plusieurs études ont mis en évidence les effets, majoritairement bénéfiques des isomères d'ALs conjugués sur la santé humaine, comme par exemple un effet sur le développement du cancer du sein (Ip *et al.*, 1991) ou encore sur la glycémie chez des patients atteints de diabète de type II (Belury 2002). Ajouté à cela, des propriétés anti-inflammatoires ont été rapportées dans plusieurs rapports précliniques révélant une diminution de l'inflammation du colon, la production de cytokine induites par les cellules immunitaires et la modulation des cytokines anti-obésité et anti-cancérogènes (Bhattacharya *et al.*, 2006). Pour finir, ces propriétés anti-inflammatoires des ALs conjugués alimentaires ont été mises en avant par plusieurs études potentiellement utilisables en santé humaine (Viladomiu *et al.*, 2016).

Afin d'évaluer les effets préventifs des bactéries probiotiques que nous avons sélectionnées sur la synergie entre l'ARA et la MA, il nous a fallu mettre en place un nouveau modèle de la MA précédemment présenté dans ce manuscrit (se référer à la partie II.B.4.c. du *Chapitre 1*). En effet, les modèles déjà existants à l'heure actuelle ne sont pas parfaitement appropriés pour l'étude physiopathologique de la MA pour notre problématique, et ce pour plusieurs raisons :

- les modèles transgéniques (souris, rat, drosophiles, *Caenorhabditis elegans*) surproduisent les peptides Aβ ce qui est surtout observé dans les formes familiales de la MA et ne constituent que 1% des cas. En revanche, les formes sporadiques, qui elles représentent 99% des diagnostics, se caractérisent plus par une diminution

de clairance cérébrale de peptides Aβ qui n'est pas reproduite dans ces modèles animaux (Bouleau & Tricoire, 2015; Götz *et al.,* 2018; Néri & Ségalat, 2003),

- les injections de peptides Aβ créent une accumulation aiguë ou chronique de peptides Aβ supérieure à ce qui existe en clinique humaine. Dans ces modèles, la modulation des compartiments périphériques comme le microbiote intestinal par exemple ne sont pas pris en compte. Ces modèles, à l'instar des modèles transgéniques, sont utilisés dans des études centrées sur le cerveau car la modification est engendrée avant tout au niveau cérébral (Kim *et al.,* 2016; Thomas *et al.,* 2017),
- Les modèles naturels (chiens, lémuriens, dégus) sont difficilement utilisables en raison de la législation et de la durée de vie des individus. De plus, et d'un point de vue sanitaire, il existe des risques d'implantation du dégu en Europe, limitant de surcroit son utilisation (Braidy *et al.,* 2015).

Pour finir, le modèle d'administration du D-galactose chez la souris, quant à lui, induit un vieillissement précoce rapporté par de très nombreux travaux et avec une fibrillation de peptides Aβ et la formation de plaques amyloïdes (Budni *et al.,* 2016; Chen *et al.,* 2016c; Rehman *et al.,* 2017) (*tableau 2 p.51*). Ce modèle, basé sur l'alimentation se justifie dans le cadre de notre problématique car il fait intervenir l'axe microbiote-intestin-cerveau et induit un vieillissement précoce par le biais d'un stress oxydant retrouvé dans la pathologie humaine. L'administration de D-galactose induit également des effets au niveau du microbiote intestinal, dans les organes périphériques mais aussi au niveau cérébral, se rapprochant plus de la physiopathologie de la MA observée chez l'homme. En effet, le modèle de D-Galactose (250 $mg.kg^{-1}.jour^{-1}$ en adéquation avec la littérature) sur une période de 6 à 8 semaines, permet d'observer des déficits des processus mnésiques chez l'animal et l'établissement d'un stress oxydant participant à l'installation d'une neuroinflammation, provoquant alors un phénotype proche de la MA chez l'animal (Budni *et al.,* 2016; Liu *et al.,* 2009) (*tableau 2 p.51*). Dans la plupart des études, une administration de D-galactose par injections sous-cutanées ou intrapéritonéales quotidienne a été favorisée, bien que le recours à un gavage unique ou par voie orale dans l'eau de boisson soient également retrouvés dans la littérature (Budni *et al.,* 2016; Chogtu *et al.,* 2018; Garcez *et al.,* 2018). Ce dernier mode d'administration *per os*, est plus éthique car il diminue le désagrément de l'animal (risque d'infection et d'inflammation localisée induite par l'injection), tout en gardant le caractère chronique proposé par des

injections quotidiennes. Par ailleurs, comme la littérature référence les effets du D-galactose entre 4 et 8 semaines, nous avons donc fait le choix de réaliser notre propre caractérisation cinétique des effets du D-galactose sur un protocole de 8 semaines avec des points de contrôle réalisés en 4ème et 6ème semaine. Cette caractérisation a inclus des mesures comportementales et biologiques afin d'appréhender au mieux les effets du D-galactose.

Notre protocole expérimental a consisté donc en une administration orale de D-Galactose à hauteur de 250 $mg.kg^{-1}.jour^{-1}$ dans les HydroGels® chez nos souris BALB/cOlaHsd mâles. Notre objectif était d'utiliser les HydroGels® comme matrice unique d'administration de l'inducteur d'un processus pathogène similaire à celui de la MA (D-galactose) et des bactéries probiotiques chargées de le combattre. Avant d'utiliser les souches candidates de bactéries probiotiques chez la souris, des expériences préliminaires ont été nécessaires dans le but d'évaluer la survie de bactéries *Streptococcus thermophilus CNRZ21* et *CNR160* ainsi que *Lactobacillus plantarum WCFS1* dans ce véhicule d'administration et dans le TGI. Les résultats de cette étude comprennent donc deux parties avec en premier lieu l'optimisation d'une administration des souches probiotiques dans l'HydroGel® ainsi que l'évaluation de leur survie dans le TGI et en deuxième lieu, la mise au point d'un modèle de vieillissement accéléré par ingestion de D-galactose. Les données résultant de ce protocole expérimental sont présentées successivement dans ce chapitre.

II. Matériel et méthode

A. Manipulations des souches probiotiques

1. Cultures bactériennes

Les trois souches de bactéries ont été mises en cultures indépendamment. Pour les souches de *S. thermophilus CNRZ21* et *CNRZ160*, une pré-culture (1%, 24h) dans du lait en poudre écrémé reconstitué à 10% stérile (de la marque Cora) suivi d'une culture (1%, 42°C, sur la nuit) dans du LM17 *broth* stérile (dont la composition est indiquée en *tableau 7*) permet d'obtenir une densité optique (à 650 nm) suffisante (5-6), assurant un minimum de 1.10^8 $UFC.mL^{-1}$.

Tableau 7 : Composition du LM17 broth.

Nom	Concentration	Référence
Tryptone	2,5 $g.L^{-1}$	Fluka, 3340917895039
Bactopeptone provenant de caséine	2,5 $g.L^{-1}$	Merck, 1.02239.0500
Peptone papaïne	5 $g.L^{-1}$	Merck, 1.07212.0500
Extrait de viande	3 $g.L^{-1}$	Merck, 1.03979.0500
Extrait autolytique de levure	2,5 $g.L^{-1}$	BD, 212750
Glycérol phosphate	19 $g.L^{-1}$	Sigma-Aldrich, C6501
Sulfate de magnésium	0,25 $g.L^{-1}$	Merck, 7487-88-9
Lactose	20 %	Sigma-Aldrich, L254

Concernant la souche de *L. plantarum WCFS1* utilisée, les conditions de culture ont été optimisées lors de ce projet de thèse. Ces optimisations ont abouti au protocole suivant : une pré-culture (1%, 42°C, 24h) dans du MRS *broth* stérile (Sigma, 69966) suivi d'une culture (1%, 42°C, sur la nuit) dans du MRS *broth* stérile permet d'obtenir une densité optique (à 600 nm) suffisante (6-7), assurant un minimum de 1.10^8 $UFC.mL^{-1}$. Lorsque les cultures de chaque bactérie ont atteint la densité optique suffisante, 21 mL de *S. thermophilus CNRZ21*, 21 mL de *CNRZ160* ainsi que 7 mL de *L. plantarum WCFS1* ont été ajoutés dans un falcon de 50 mL. La seconde étape du protocole a donc été de centrifugées (10 min, 5 000g, 4°C) le mélange de bactéries de manière à culoter l'ensemble des 3 souches. Le surnageant a ensuite été éliminé et le culot bactérien resuspendu au vortex et additionné de PBS-Glycérol (Sigma-Aldrich, G9012) en concentration finale de 16%.

Pour la suite du protocole, une confrontation entre cultures bactériennes fraîches et congelées a été réalisée. La validation d'une administration de bactéries préparées à l'avance et conservées à -20°C permet d'envisager une meilleure optimisation et homogénéisation des méthodes de culture et de conservation des bactéries. A ce titre, les culots bactériens ont suivi l'ensemble des étapes du protocole soit le jour même de l'expérimentation soit en amont et conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

2. Étude de survie des probiotiques dans une matrice d'eau gélifiée

Pour s'affranchir du gavage des animaux de manière quotidienne durant plusieurs semaines, les probiotiques et le D-galactose ont été inclus dans une matrice d'eau gélifiée (Hydrogels® (ClearH_2O, 70-01-5022)) utilisée lors du transport d'animaux. La validation de la survie des probiotiques dans un HydroGel® contenant du D-Galactose a été une étape nécessaire afin de nous permettre de réaliser une étude animale en co-administration. Différentes conditions ont été testées dans le but d'optimiser la survie des bactéries en HydroGel®. Les bactéries ont ainsi été mises en présence de différents sucres tels que le glucose (Merck, G9270), le lactose (Sigma-Aldrich, L254), le D-Galactose (Merck, G0750) ou sans sucre de manière individuelle puis de manière conjointe afin de valider la survie des bactéries jusqu'à 48h dans l'HydroGel® à température ambiante.

Les HydroGels® ont été réalisés de la manière suivante : ils ont été chauffés 20 min à 62°C afin de les liquéfier puis mélangés au culot des trois bactéries probiotiques frais ou conservées à -20°C, additionnés soit de 7 mL de Lactose à 20%, de 7 mL de Glucose à 20%, de 850 µL de D-Galactose à 15g/L ou de 7mL d'eau distillée stérile, ainsi que de 750µL de NaOH 1 M afin d'équilibrer le pH, puis coulés dans des nombreros (Nombrero | Wet Diet Feeder, Datesand Group) (*Figure 54*). Quatre portions d'HydroGel® ont par la suite été prélevées afin de réaliser des dilutions en cascades. Les dilutions de 10^{-6} à 10^{-9} sont ensuite étalées en profondeur sur gélose spécifique aux *S. thermophilus* (LM17) ou à *L. plantarum WCSF1* (MRS) dans le but de réaliser des dénombrements des colonies bactériennes.

Figure 50 : Visualisation d'HydroGel® et de nombrero. D'après datesand.

B. Expérimentations *in vivo*

1. Animaux et conditions d'hébergement

Les animaux utilisés dans cette étude sont de la même souche, sexe et âge que ceux décrits dans le *Chapitre 4*. Les animaux ont été regroupés par 4 dans des cages transparentes comprenant de l'enrichissement (matériel de nidification et tunnel) avec accès *ad libitum* à l'eau de boisson et à la nourriture après une période d'acclimatation de deux semaines pour l'étude de la survie des probiotiques dans le TGI. En revanche, pour l'évaluation du mode d'administration du D-galactose, les animaux ont été isolés en début de protocole afin d'évaluer la consommation alimentaire et de limiter les comportements de dominance dans les cages. Ces animaux présentent les mêmes enrichissements que ceux précédemment cités.

Les procédures d'expérimentations ont été réalisées dans le cadre de la réglementation française en vigueur et en conformité avec la Directive Européenne (2010/63/UE) prenant en compte la règle des 3R (réduction, raffinement, remplacement) et le bien-être animal. Les deux protocoles ont été approuvés par le Comité d'Éthique Lorrain en matière de réglementation animale (CELMEA) référencé sous le numéro de dossier APAFIS23897-2020010917441093 pour l'évaluation de la survie des probiotiques dans le TGI et APAFIS14324-2018032917508930 pour l'évaluation du mode d'administration orale du D-galactose.

2. Survie des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal de la souris

Lors de cette expérience, nous avons utilisé au total 16 souris BALB/cOlaHsd mâles regroupées par cage de 4, âgées en début de protocole de 8 semaines. Ces animaux ont été subdivisés en 2x2 groupes (n=4/groupe) de traitement :

- les animaux nourris avec le régime « HL-ARA » ayant soit les bactéries issues de cultures fraiches ou celles issues de cultures congelées et,
- ceux nourris avec le régime « HL+ARA » ayant soit les bactéries issues de cultures fraiches ou celles issues de cultures congelées afin de pouvoir optimiser et homogénéiser les méthodes de culture et de conservation des bactéries.

Les animaux ont été nourris avec le régime adapté à leur appartenance en termes de groupe puis mis à mort en fin de protocole afin de réaliser des études microbiologiques sur la muqueuse colique.

Deux études de survies des bactéries probiotiques *L. plantarum WCFS1* et *S. thermophilus CNRZ21* et *CNRZ160* issues de cultures fraiches ou congelées, dans le TGI de la souris ont été réalisées ici : une première étude sur des souris non familières aux régimes modérément hyperlipidiques et une seconde étude sur des souris ayant été soumises à 4 semaines de régimes « HL+ARA » ou « HL-ARA » afin de rendre compte de l'impact des régimes sur la survie des probiotiques dans le TGI. Le microbiote fécal étant modifié par le régime alimentaire, nous avons voulu nous assurer de l'absence d'effet d'un régime modérément hyperlipidique enrichi ou non en ARA sur la survie des bactéries probiotiques administrées. Pour cela, les bactéries *S. thermophilus* et *L. plantarum* (en concentration minimale de 10^8 UFC.mL^{-1}, préparation détaillée ci-dessus) ont été administrées au moyen d'Hydrogels® aux animaux à la suite d'un premier prélèvement de fèces (t0h). Puis, différents prélèvements de fèces ont été effectués à t6h, t24h et t48h après mise en place de l'hydrogel dans la cage. Les animaux ont été nourris à partir du premier prélèvement jusqu'à leur mise à mort avec un des deux régimes : « HL-ARA » ou « HL+ARA ». A la fin des quatre semaines de régime, les animaux ont été mis à mort dans le but de réaliser une étude de l'implantation des probiotiques dans la muqueuse colique (*Figure 55*).

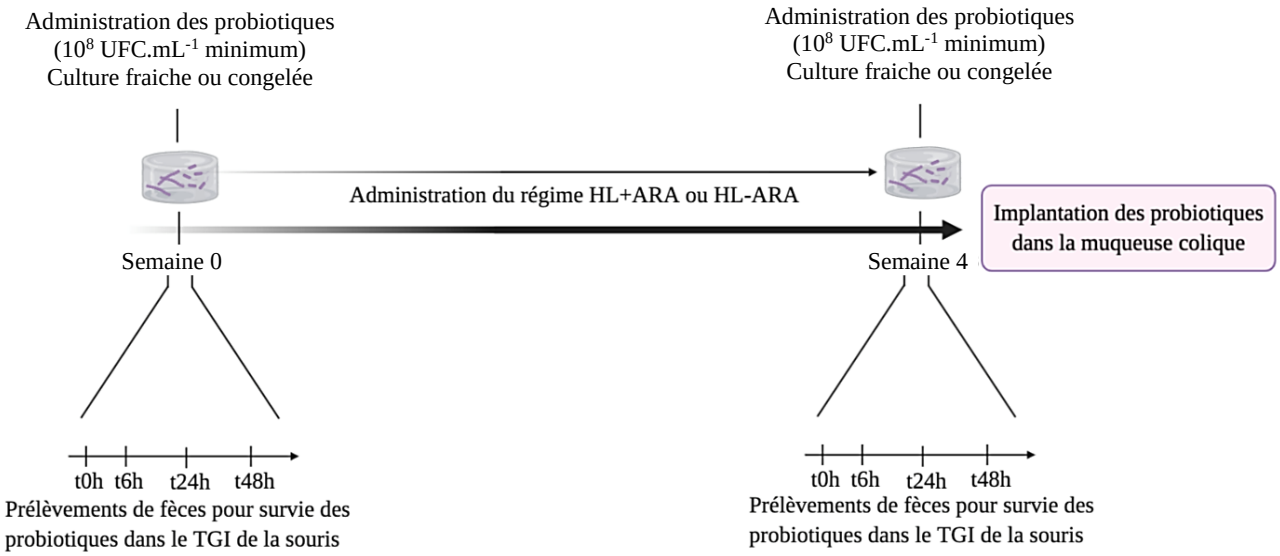


Figure 51 : Schéma expérimental de la survie des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal. Figure réalisée avec BioRender.

3. Concentration en *S. thermophilus* et *L. plantarum WCFS1* dans les fèces

L'étude de survie des probiotiques a été réalisée à partir de prélèvements de fèces diluées au 1/10ème dans du PBS stérile et homogénéisées par retournement au moyen de billes en inox (Dutscher, 078176). Des dilutions en cascade de 10^{-1} à 10^{-9} ont été réalisées puis 0,1 mL des dilutions 10^{-6} à 10^{-9} ont été étalées en surface sur gélose sélective : MRS agar pour *L. plantarum WCFS1* et LM17N (LM17 additionné d'acide nalidixique à hauteur de 40 µg.mL^{-1} - Sigma-Aldrich - comme inhibiteur des bactéries Gram-négatives présentes dans les fèces des animaux) pour *S. thermophilus*.

Les bactéries ont ensuite été incubées 24 heures (pour *S. thermophilus*) ou 48 heures (pour *L. plantarum WCFS1*) à 42°C avant que les colonies bactériennes ne soient comptées manuellement. La flore fécale de l'animal étant diverse en termes de bactéries, nous avons soustrait les bactéries de la flore de base (prélevées en début de chaque étude de survie soit t0h) à celles des prélèvements réalisés à la suite d'administration des probiotiques.

4. Mise en place du modèle de D-Galactose

Lors de cette expérience, nous avons utilisé au total 28 souris BALB/cOlaHsd mâles isolées, âgées en début de protocole de 8 semaines. Les animaux nourris avec le régime « HL-ARA » ayant montré une augmentation des bactéries *Bifidobacterium pseudolongum*, dans le microbiote fécal, nous nous sommes intéressés à la validation du modèle de D-galactose lorsque l'animal est nourri avec un régime favorisant un bon environnement intestinal.

Pour ce faire, les animaux ont été subdivisés en deux groupes (n=14 animaux par groupe) de traitement : le groupe « HL-ARA/D-Galactose », et le groupe « HL-ARA/Vehicule ». Notre protocole se déroule sur une durée de 8 semaines durant lesquelles le régime « HL-ARA » ainsi que le D-Galactose (contenu dans de l'Hydrogels® à hauteur de 250 mg.kg^{-1}jour^{-1}) ou le véhicule (HydoGels® dont le D-galactose a été remplacé par de l'eau distillée) ont été administrés à la suite d'un premier prélèvement de fèces. Différents prélèvements de fèces ont été réalisés à 6 et 8 semaines en vue de réaliser une analyse du microbiote fécal. Différents tests de comportement ont été effectués pour évaluer la fonction mnésique et la motricité : des tests de labyrinthe en Y à la 4ème, 6ème et 8ème semaine de protocole, un openfield au cours de la 6ème semaine ainsi que le test de la piscine de Morris entre la 6ème et

8ème semaine de protocole. Lors de la 6ème semaine, les animaux ont été subdivisés en deux groupes :

- 8 animaux (4 animaux par groupe) ont été mis à mort afin de rendre compte de l'installation du stress oxydant à partir de la 6ème semaine chez l'animal
- Le reste des animaux a continué le protocole et ont été soumis au test de la piscine de Morris ainsi qu'à un dernier test de Labyrinthe en Y, pour rendre compte d'un déclin cognitif entre la 6ème et 8ème semaine.

A la fin de la 8ème semaine de protocole, l'ensemble des animaux a été mis à mort dans le but de réaliser une étude du stress oxydant au moyen du dosage des TBARS (*Figure 56*).

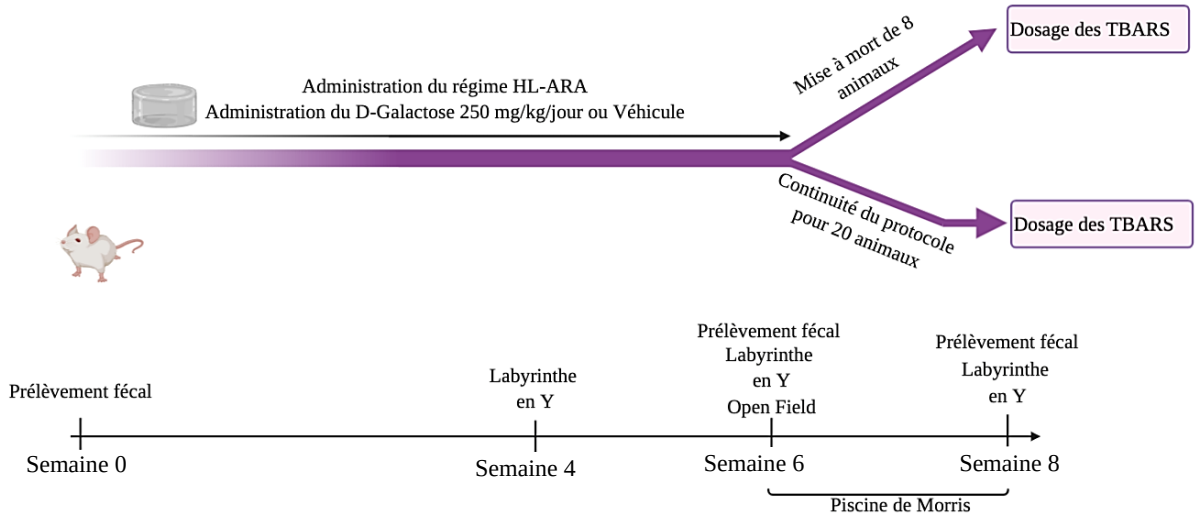


Figure 52 : Schéma expérimental permettant d'évaluer les effets d'une administration per os de D-galactose. Figure réalisée avec BioRender.

5. Analyses comportementales

a. Etude de la mémoire à court terme via le test de la reconnaissance d'objet

Ce test comportemental est utilisé pour étudier l'apprentissage et la mémoire à court terme chez la souris en utilisant un openfield rond de 30 cm de diamètre et 30 cm de hauteur éclairé par une lumière blanche (40 lux au centre du dispositif). L'évaluation s'est déroulée sur 2 jours consécutifs d'expérimentation suivant 3 étapes bien distinctes.

Le premier jour, l'animal a été déposé tête face à la paroi proche de l'expérimentateur afin de s'habituer au dispositif. La souris a été libre d'explorer l'openfield durant 10 min puis a été retirée du dispositif afin de retourner dans sa cage d'hébergement.

Le lendemain, deux objets identiques (des canettes d'oasis tropical de 33 cL ou des flasques de culture cellulaire de 50 mL) ont été déposés à environ 8 cm des parois. La distribution des paires d'objets s'est effectuée de manière aléatoire, afin de limiter toute préférence innée de l'animal pour un objet en particulier. L'animal a ensuite été déposé dans le dispositif comme précédemment et le temps d'exploration de chaque objet a été mesuré indépendamment. La durée d'acquisition a été de 10 min.

Après un délai de trente minutes à la suite de la phase de découverte de la paire d'objets, un des deux objets a été remplacé aléatoirement par un second de taille, de forme et de matière différente (la canette étant remplacée par la flasque et inversement). L'animal a été déposé comme précédemment et a été libre d'explorer pendant les 10 min de test chaque objet. A la suite de l'acquisition, le temps d'exploration de chaque objet a été mesuré. Afin d'interpréter ces résultats, deux indices peuvent être calculés (Antunes & Biala, 2012) :

- L'indice de discrimination (ID) permet de mettre en évidence la discrimination des souris du nouvel objet, comparativement à l'objet familier. Il correspond au rapport de temps d'exploration suivant :

$$ID = \frac{Tnouveau - Tfamilier}{Tnouveau + Tfamilier}$$

- L'indice de reconnaissance (IR) permet de savoir si les animaux ont mis en mémoire les particularités de l'objet familier et s'ils sont plus attirés par l'objet nouveau ou non. Il correspond au rapport de temps d'exploration suivant :

$$IR = \frac{Tnouveau}{Tnouveau + Tfamilier}$$

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés exclusivement à l'indice de discrimination afin d'interpréter nos résultats.

b. Étude de la mémoire à court terme via le test du labyrinthe en Y

Le protocole réalisé dans cette seconde étude est le même que celui réalisé dans l'étude précédente (se référer au *Chapitre 4, p.129*).

c. Étude de la mémoire à long terme et de l'apprentissage

La mémoire à long terme, la mémoire spatiale de référence ainsi que l'apprentissage ont été mesurés par l'intermédiaire du test de la piscine de Morris chez la souris. Le dispositif a consisté en un réservoir circulaire de 80 cm de diamètre et 60 cm de hauteur, rempli au 2/3 d'eau maintenue entre 19 et 21°C. Une plateforme de position fixe est ajoutée à la piscine, apparente lors de la phase d'habitation, immergée lors de la phase d'apprentissage et retirée lors de la phase de restitution. Des indices spatiaux ont été placés aux bords de la piscine de façon que l'animal puisse se repérer et retrouver la position de la plateforme (Morris, 1984). Le dispositif a été placé sous lumière blanche, le nombre de lux étant mesuré par l'intermédiaire d'un luxmètre (40 lux au centre de la piscine). Ce test s'est déroulé en trois phases (*Figure 57, p.199*):

- **La phase d'habituation** a été réalisée avant d'entamer la phase d'apprentissage. Cette phase est primordiale, car elle permet à l'animal de se familiariser avec les conditions expérimentales et d'appréhender la nage dans les conditions décrites précédemment. Les repères spatiaux sont dissimulés et la souris doit rejoindre une plateforme visible dont la position est modifiée à chaque essai. Une série de 4 essais de 1 minutes séparés de 45 minutes a été réalisée durant un jour.
- **La phase d'apprentissage** permet à l'animal de mettre en place une carte mentale reliant la position de la plateforme avec les indices visuels disposés sur les bords de la piscine. Les animaux ont alors été divisés en sous-groupes pour lesquels la position de la plateforme a été déterminée aléatoirement préalablement à la phase d'apprentissage dans le but d'éviter les biais dus à la préférence des animaux pour un quadrant donné et pour un indice visuel. L'animal a ensuite été déposé dans des quadrants différents à chaque essai afin d'éviter la mise en place de stratégies non spatiales durant l'apprentissage. Cette phase a été réalisée sur 4 jours consécutifs et a regroupé des séries quotidiennes de 4 essais de 1 minute séparées de 45 minutes chacun. Le délai pour rejoindre la plateforme (quadrant cible) ainsi que la distance parcourue et la vitesse de nage ont été quantifiés via le logiciel ANYMAZE.

- **La phase de restitution** ou *probe test* permet d'évaluer les capacités de mémoire à long terme grâce à la trace mnésique persistant jusqu'à 3 jours après la dernière session de la phase d'apprentissage. A ce titre, un essai unique de 1 minute a été réalisé. L'animal est déposé dans le quadrant opposé à celui de la plateforme (position établie lors de la phase d'apprentissage) bien que celle-ci ait été retirée afin d'analyser la trajectoire de l'animal. Le délai d'entrée dans le quadrant cible ainsi que la vitesse de nage ont été quantifiés par le même logiciel que précédemment (*Figure 57*).

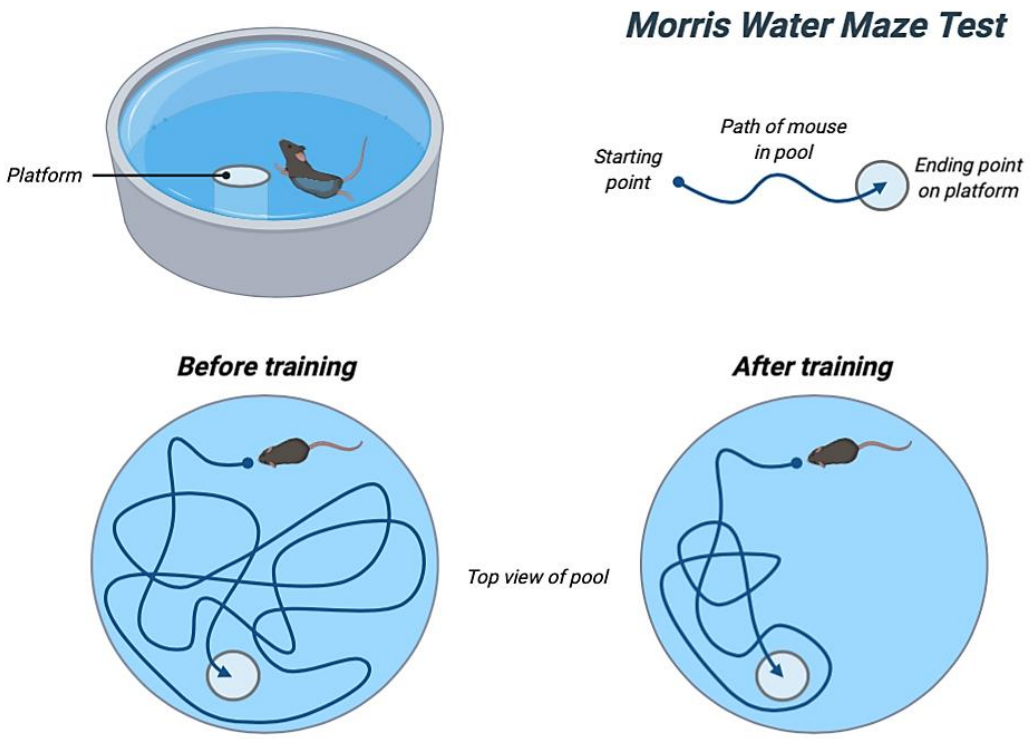


Figure 53 : Schéma de la piscine de Morris. La souris a pour objectif de retrouver le chemin de la plateforme immergée en mettant en place des processus mnésiques. Avant les différentes sessions d'entrainement, l'animal recherche de manière aléatoire la plateforme. Il va mémoriser via les repères spatiaux localisés dans les différents quadrants de la piscine de Morris l'emplacement de cette plateforme. Après les sessions d'entrainement, l'animal est capable de retrouver la plateforme rapidement grâce aux processus mnésiques mis en œuvre. Figure réalisée avec BioRender.

d. Étude de l'anxiété

Openfield

Le test de l'openfield est utilisé afin de mesurer la motricité. Le dispositif a consisté en une arène circulaire de 35 cm de diamètre et de 30 cm de hauteur exposée à 40 lux au centre du dispositif.

Le dispositif a été subdivisé virtuellement en trois zones bien distinctes :

- une zone dite périphérique, la plus externe, dans laquelle l'animal se déplace par thigmotactisme (déplacement de l'animal au moyen d'un contact entre les vibrisses et la paroi). Cette zone est une zone qui se veut rassurante pour l'animal,
- une zone dite intermédiaire faisant la transition entre la zone périphérique et centrale,
- une zone dite centrale au milieu du dispositif qui se veut anxiogène pour l'animal car ouverte sur l'environnement. Une augmentation du temps passé dans cette zone et du nombre d'entrée dans cette zone indique une anxiété moindre chez l'animal.

Lors du test, l'animal a été déposé tête face à la paroi proche de l'expérimentateur. La souris a été libre d'explorer l'openfield durant 10 min puis a été retirée du dispositif afin de retourner dans sa cage d'hébergement. Le temps passé, ainsi que la latence et le nombre d'entrée dans chaque zone sont quantifiés durant ces 10 min. Un animal plus anxieux se caractérisera par un temps plus important dans la zone périphérique, une latence d'entrée dans les zones intermédiaire et centrale plus longue et un nombre d'entrée dans chaque zone plus réduit qu'un animal contrôle. La distance parcourue dans la zone centrale, la latence de première entrée dans la zone centrale ainsi que le temps d'immobilité, le nombre d'épisodes d'immobilité et la vitesse moyenne des animaux ont été mesurés lors de ce test avec le même logiciel que celui cité précédemment.

C. Dosage des TBARS – stress oxydant

La mesure des TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*) est une méthode utilisée dans le but de mettre en évidence des modifications de peroxydation lipidique, un mécanisme de lésion cellulaire chez les plantes et les animaux. Cette mesure est utilisée comme indicateur du stress oxydant dans les cellules et les tissus. Les peroxydes lipidiques, dérivés des AGPIs, sont instables et se décomposent pour former une série complexe de composés, qui comprennent des composés carbonylés réactifs, tels que le MDA. Dans les plaquettes humaines, la thromboxane synthase catalyse également la conversion de PG H2 en TX A2, acide 12-hydroxyheptadécatrenoïque (12 (S) -HHTrE) et MDA dans un rapport 1:1:1. Le kit de dosage TBARS (Cayman, 10009055) permet de doser la peroxydation lipidique dans le plasma, le sérum, l'urine, les homogénats tissulaires ou encore les lysats cellulaires. L'adduit MDA- acide thiobarbiturique formé par la réaction de MDA et d'acide thiobarbiturique à haute température

(90 ° - 100 ° C) dans des conditions acides est mesuré par colorimétrie à 530-540 nm (*Figure 58*).

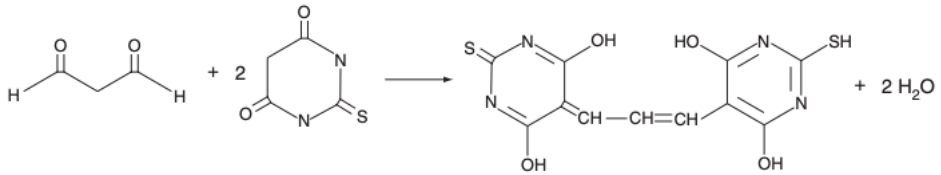


Figure 54 : Principe du dosage des TBARs via le kit Cayman. MDA : Malondialdéhyde, TBA : Thiobarbituric acid.

L'ensemble de l'expérimentation a été réalisé suivant les recommandations du fournisseur. 100 µL d'échantillon additionné de 100 µL de SDS et 4 mL de réactif coloré de Cayman ont été portés à ébullition durant 1 heure au bain marie avant de subir un arrêt de réaction par incubation de 10 min dans la glace. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 10 min à 1 600 g à 4°C puis le surnageant a été mesuré à 540 nm. Le niveau de TBARS du plasma a été quantifié au moyen d'une gamme standard de MDA préparée de 0 à 50 µM.

D. Etudes statistiques

Au même titre que l'étude du *Chapitre 4*, les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad (GraphPad Software Inc.). En raison d'un nombre trop faible de données pour l'optimisation de l'administration des bactéries et leur survie dans le TGI (données de 2 à 4 animaux par groupe), seuls les résultats de la mise au point du D-galactose ont pu être analysés statistiquement. La significativité est accordée dès lors que le risque d'erreur p-value est égal ou inférieur à 5%. La normalité de l'ensemble des données a été soumise à vérification grâce au test de Kolmogorov-Smirnov. Les données qui suivent la loi normale ont été analysées par l'intermédiaires du test de Student et sont représentées sous forme de moyenne ± SEM (erreur standard à la moyenne) pour chaque analyse.

III. Résultats

A. Étude de la survie des bactéries probiotiques dans une matrice Hydrogel ® et dans le tractus gastrointestinal des souris BALB/cOlaHsd

1. Survie des bactéries dans l'HydroGel®

Cette méthode innovante d'administration de bactéries probiotiques chez l'animal n'étant ni connue, ni expérimentée au sein du laboratoire Calbinotox, plusieurs mises au point ont été nécessaires avant d'employer cette approche. La première étape fut d'évaluer la cinétique de viabilité des probiotiques dans l'Hydrogel® jusqu'à 48h. Cette étape nécessitait en premier lieu d'étudier la survie de bactéries individuelles en présence de différents sucres (listés ci-dessous) :

- le lactose ou le glucose, sucres utilisés par les bactéries pour se développer,
- le D-Galactose sur lequel repose notre modèle de vieillissement précoce (facilitant de surcroit le mode d'administration de ce sucre en évitant des injections sous-cutanées ou intrapéritonéales quotidiennes répétées sur plusieurs semaines comme utilisées dans bon nombre d'études),
- sans sucre comme condition contrôle de la croissance des bactéries sans apport pour leur développement.

Notre attention s'est portée sur *L. plantarum WCFS1* ainsi que *S. thermophilus CNRZ21* (*S. thermophilus CNRZ160* présentant les mêmes caractéristiques de croissance que *CNRZ21*, nous avons extrapolé les résultats de *CNRZ21* à l'autre souche de *S. thermophilus*). Les résultats de l'étude de survie des bactéries *S. thermophilus CNRZ21* (*Figure 59A, p.204*) ont montré une diminution de la concentration bactérienne au cours du temps. Les bactéries ajoutées à un HydroGel® ne contenant aucun sucre possèdent une survie plus faible que lorsqu'elles sont en contact avec un des trois sucres (*Figure 59A, p.204*), avec une perte de moins de deux logarithmes. L'incorporation des bactéries dans un HydroGel® contenant du Glucose, du Lactose ou du D-Galactose montre une survie équivalente, avec une diminution d'un logarithme entre le début de l'expérimentation et après 48h.

Concernant les résultats de survie de *L. plantarum WCFS1*, la survie dans l'HydroGel® est optimale en présence de lactose et de glucose. A l'inverse, une diminution de la concentration bactérienne est observée lorsque les bactéries sont mises en présence de D-

Galactose ou encore lorsqu'elles sont incorporées seules dans l'HydroGel® en absence de sucre (*Figure 59B, p.204*), avec une baisse de plus d'un logarithme. En revanche, en présence de lactose ou de glucose, la concentration bactérienne gagne un peu moins d'un logarithme en 24h, ce qui suggère une stabilité de la souche voire une croissance de *L. plantarum* dans l'HydroGel®.

Ces premières analyses ont révélé la nécessité d'incorporer du lactose ou du glucose dans l'HydroGel® afin d'optimiser la survie des bactéries probiotiques. A partir de cette donnée, la survie des bactéries en présence combinée de lactose et de D-Galactose a été réalisée. Cette étude permettait de déterminer si la présence de lactose améliorait la survie des bactéries lorsqu'elles sont mises en présence de D-Galactose. Cette étude a été réalisée sur un culot regroupant les trois bactéries, préparé un mois en avance et conservé dans du PBS-glycérol 16%.

D'après les résultats présentés en *figure 59C* (*p.204*), la survie des probiotiques *L. plantarum WCF*S1 et *S. thermophilus CNRZ21* et *CNRZ160* a été optimale lorsque l'on ajoute du lactose en plus du D-Galactose dans l'HydroGel® (perte d'un logarithme en moyenne). En effet, lorsque les bactéries sont incorporées dans l'HydroGel® en présence de D-Galactose, la concentration bactérienne dans l'HydroGel® baisse plus que lorsque les bactéries sont en présence conjointe de D-Galactose et de lactose. Cette étude a aussi montré que la congélation en condition PBS-Glycérol 16% du culot bactérien réunissant les trois bactéries n'affecte que faiblement la concentration bactérienne initiale, nous permettant de réaliser les culots bactériens tous les mois en grande quantité et de les conserver à -20°C (*Figure 59C, p.204*). Cette méthode de conservation a donc permis d'optimiser les concentrations bactériennes observées dans les culots et également d'homogénéiser les culots bactériens utilisés.

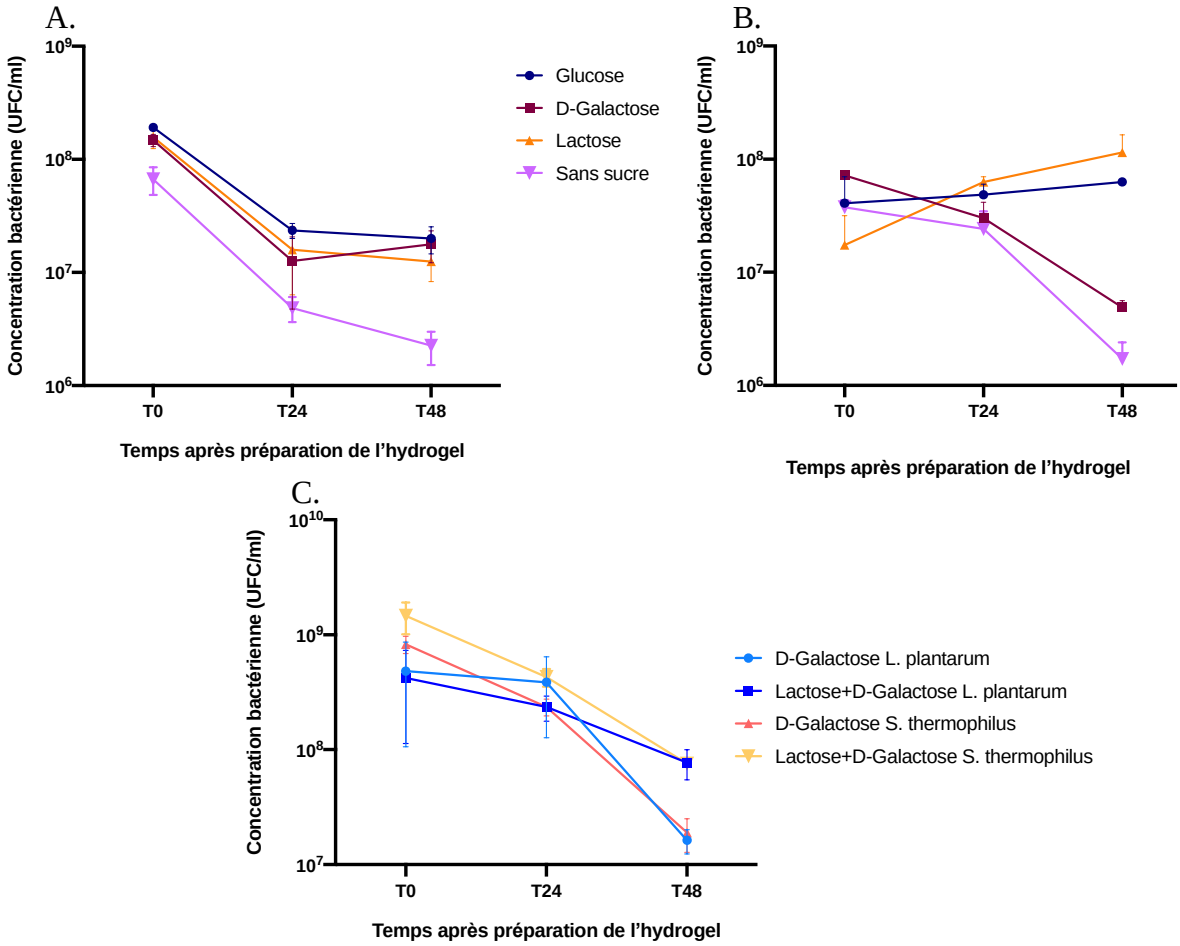


Figure 55 : Test de survie de S. thermophilus CNRZ21 (A) et L. plantarum WCFS1 (B) de 0 à 48h dans un HydroGel® en présence de Glucose, de D-Galactose, de lactose et en l'absence de sucre.

2. Survie des bactéries dans le tractus gastro-intestinal de souris BALB/cOlaHsd males

En présence du régime « HL-ARA », cette étude a montré une sortie des bactéries vivantes du corps de l'animal à partir de 6h après mise en place de l'HydroGel® dans la cage. La sortie de bactéries vivantes se poursuit jusqu'à 24-48h suivant les souches de bactéries (*tableaux 8 et 9*) en présence du régime « HL-ARA » chez des souris non habituées au régime, et après 4 semaines d'administration du régime. Aux vues de ces résultats, il n'est pas possible à ce stade de déterminer si des différences entre groupe existent, en raison du faible nombre d'animaux dans chaque étude et de la grande variabilité inter-individuelle.

Tableau 8 : Données chiffrées des tests de survie réalisés sur les bactéries S. thermophilus CNRZ21 et CNRZ160 en présence du régime « HL-ARA ». L'étude 1 a été réalisée en début de protocole (souris non habituées au régime) et l'étude 2 sur ces mêmes souris ayant été nourries avec le régime « HL-ARA » durant 4 semaines. N=2-4 animaux/groupe. Les résultats comprennent la soustraction de la flore de base de l'animal, sont exprimés en 10^{10} pour plus de visibilité et présentés sous forme de moyenne ±SEM. Le symbole «-» indique un retour à la flore de base de l'animal.

HL-ARA *S. thermophilus*	Culture congelée T0	Culture congelée T6	Culture congelée T24	Culture congelée T48
Etude 1 : Sem0	-	0,71±0,88	64,55±27,01	0,12±0,21
Etude 2 : Sem4	-	321,40±333,74	556,11±314,51	-

HL-ARA *S. thermophilus*	Culture fraîche T0	Culture fraîche T6	Culture fraîche T24	Culture fraîche T48
Etude 1 : Sem0	-	49,72±80,51	14,69±8,06	-
Etude 2 : Sem4	-	0,16±0,35	180,36±133,85	-

Tableau 9 : Données chiffrées des tests de survie réalisés sur les bactéries L. plantarum WCFS1 en présence du régime « HL-ARA ». N=2-4 animaux/groupe. Les résultats comprennent la soustraction de la flore de base de l'animal, sont exprimés en 10^{10} pour plus de visibilité et présentés sous forme de moyenne ±SEM. Le symbole «-» indique un retour à la flore de base de l'animal.

HL-ARA *L. plantarum*	Culture congelée T0	Culture congelée T6	Culture congelée T24	Culture congelée T48
Etude 1 : Sem0	-	9,17±8,77	7,31±3,32	0,01±0,04
Etude 2 : Sem4	-	789,18±777,41	138,07±109,31	-

HL-ARA *L. plantarum*	Culture fraîche T0	Culture fraîche T6	Culture fraîche T24	Culture fraîche T48
Etude 1 : Sem0	-	111,99±116,01	2,57±1,29	0,01±0,03
Etude 2 : Sem4	-	3,65±2,90	34,04±32,14	0,28±0,13

Comme pour le régime « HL-ARA », l'étude de survie en présence du régime « HL+ARA » a montré une sortie des bactéries vivantes du corps de l'animal à partir de 6h après mise en place de l'HydroGel® dans la cage. La sortie de bactéries vivantes se poursuit jusqu'à 24-48h suivant les souches de bactéries, bien qu'une contamination à t48h pour l'étude de survie de *S. thermophilus* ait été observée lors de la première étude de survie et n'a pas donc pu être comptabilisée (*tableaux 10 et 11*).

Tableau 10 : Données chiffrées des tests de survie réalisés sur les bactéries S. thermophilus CNRZ21 et CNRZ160 en présence du régime « HL+ARA ». N=2-4 animaux/groupe. Les résultats comprennent la soustraction de la flore de base de l'animal, sont exprimés en 10^{12} pour plus de visibilité et présentés sous forme de moyenne ±SEM. Le symbole «-» indique un retour à la flore de base de l'animal.

HL+ARA *S. thermophilus*	Culture congelée T0	Culture congelée T6	Culture congelée T24	Culture congelée T48
Etude 1 : Sem0	-	2,97±2,61	24,74±12,34	Contaminations
Etude 2 : Sem4	-	163,96±146,83	181,37±104,42	0,24±0,24

HL+ARA *S. thermophilus*	Culture fraîche T0	Culture fraîche T6	Culture fraîche T24	Culture fraîche T48
Etude 1 : Sem0	-	2,70±2,69	68,48±41,96	Contaminations
Etude 2 : Sem4	-	366,22±127,82	144,62±98,58	6,65±4,18

Tableau 11 : Données chiffrées des tests de survie réalisés sur les bactéries L. plantarum WCFS1 en présence du régime « HL+ARA ». N=2-4 animaux/groupe. Les résultats comprennent la soustraction de la flore de base de l'animal, sont exprimés en 10^{12} pour plus de visibilité et présentés sous forme de moyenne ±SEM. Le symbole «-» indique un retour à la flore de base de l'animal.

HL+ARA *L. plantarum*	Culture congelée T0	Culture congelée T6	Culture congelée T24	Culture congelée T48
Etude 1 : Sem0	-	0,01±0,01	0,95±0,42	0,74±0,42
Etude 2 : Sem4	-	28,63±28,12	12,62±6,49	0,04±0,03

HL+ARA *L. plantarum*	Culture fraîche T0	Culture fraîche T6	Culture fraîche T24	Culture fraîche T48
Etude 1 : Sem0	-	0,03±0,02	6,18±4,16	2,68±1,82
Etude 2 : Sem4	-	82,94±16,05	5,62±2,87	0,04±0,04

Les deux régimes alimentaires « HL-ARA » et « HL+ARA » n'empêchent donc pas la sortie de bactéries vivantes dans les fèces. Les bactéries vivantes sont retrouvées dans les fèces dès 6h et ce, jusqu'à 24 à 48h avec une plus forte concentration bactérienne après 6h. Le faible nombre d'animaux dans cette étude (entre 2 et 4 animaux par groupe), ne permet pas de comparer efficacement l'ensemble des données, de même que nous ne pouvons garantir que la concentration dans chaque HydroGel® lors de la mise à disposition dans la cage soit identique ou altérée au cours du temps dans les conditions environnementales de l'animalerie. Par ailleurs, ce mode d'administration ne permet pas de contrôler la portion d'HydroGel® et donc de probiotiques ingérée par chaque animal, d'autant plus lorsque des relations de dominances sont présentent dans les cages. Le but de cette étude était de garantir la présence de bactéries vivantes dans les fèces et de déterminer le temps de présence potentielle de ces bactéries dans le TGI. A ce titre, nous avons observé que les bactéries étaient encore présentes et vivantes après 24h dans les fèces et suivant les souches, jusqu'à 48h. La survie n'est également impactée ni par le type de régime ni par les modifications du microbiote intestinal induites par ces régimes.

B. Mise en place d'un modèle de vieillissement précoce par administration orale de D-galactose – impact de différents régimes alimentaires

1. *Suivi pondéral des souris et de leurs organes*

Les animaux ont été pesés de façon hebdomadaire afin de vérifier la survenue d'une prise ou perte de poids. D'après les résultats de courbes de poids, aucune modification entre les groupes n'a été mise en évidence, les animaux présentent la même croissance pour le groupe « HL-ARA/Véhicule » ou « HL-ARA/D-galactose », et ce durant les 8 semaines du protocole. A la suite de la mise à mort des animaux, les organes (colon, intestin, foie, tissus adipeux mésentérique et épididymaire ainsi que le cortex, le cervelet et les hippocampes) ont été collectés et pesés. Aucune différence n'a été constatée (*Figure 60*) entre les groupes expérimentaux, « HL-ARA/Véhicule » et « HL-ARA/D-Galactose » à 6 et 8 semaines d'administration.

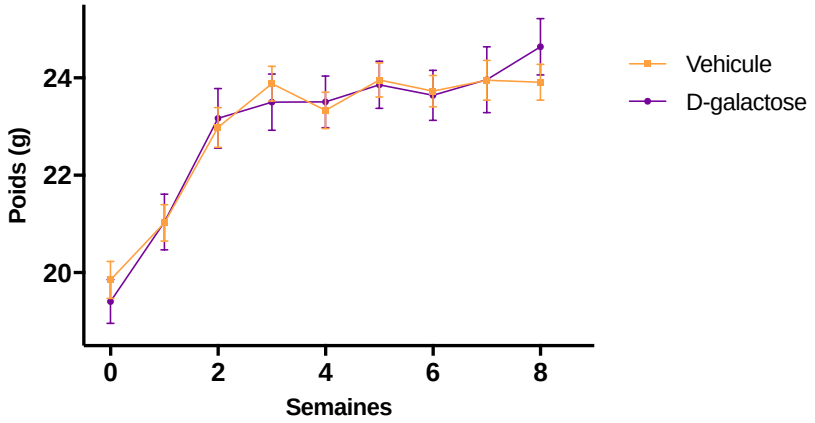


Figure 56 : Courbe de poids des animaux « HL-ARA/Vehicule » et « HL-ARA/D-galactose » administrés durant 6 ou 8 semaines. Les différents points représentent la moyenne ± SEM. N =14 animaux/groupe jusqu'en semaine 6 où le nombre d'animaux diminue à 10/groupe.

2. *Analyse comportementale*

a. *Reconnaissance d'objet*

Les résultats de la reconnaissance d'objet ne montrent aucune différence entre les groupes « HL-ARA/Véhicule » et « HL-ARA/D-Galactose » (*Figure 61A, p.208*). En revanche, l'analyse statistique a révélé que les animaux « HL-ARA/Véhicule » présentaient une

préférence pour l'un des objets faussant ainsi le test réalisé. En effet, l'indice de discrimination est plus faible pour les animaux « Véhicule » ayant reçu la flasque en tant qu'objet familier indiquant que les animaux passent plus de temps sur l'objet familier que l'objet nouveau (*Figure 61B*).

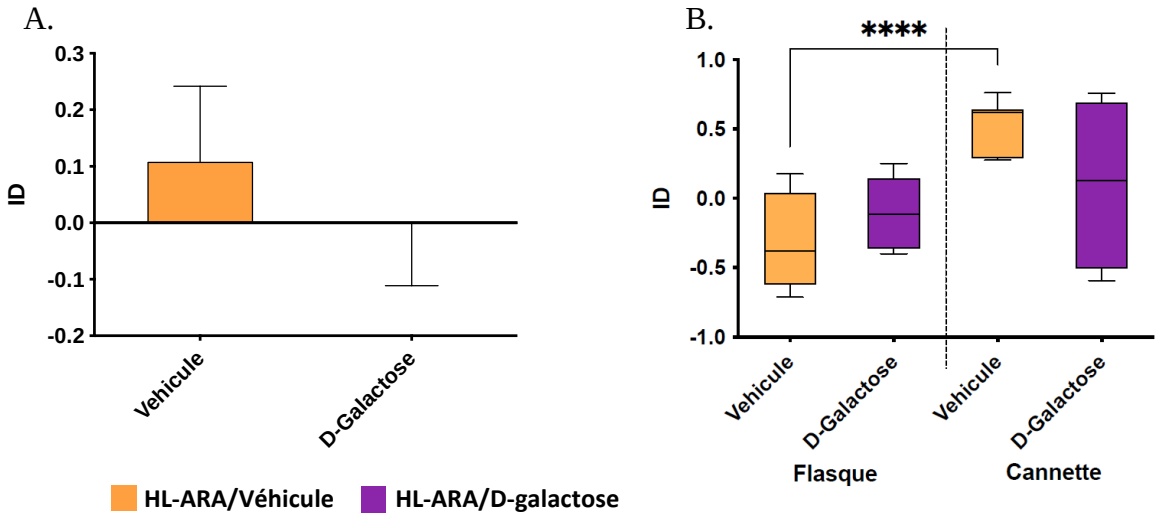


Figure 57 : Résultats du test de reconnaissance d'objet réalisé lors de la 6ème semaine.

*Le temps passé sur chaque objet est comptabilisé et l'indice de discrimination (ID) est calculé. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne±SEM pour les résultats globaux (A) et sous forme de box and whiskeys min to max pour les résultats répartis suivant l'objet familier de l'animal (flasque ou cannette) en (B) N=14 animaux/groupe. **** p-value<0,0001 Véhicule Flasque vs Véhicule Cannette.*

b. Labyrinthe en Y

Trois tests de labyrinthe en Y ont été réalisés sur l'ensemble des animaux afin de rendre compte de l'apparition du déclin cognitif après 4, 6 et 8 semaines d'administration de D-galactose (*Figure 62, p.209*). Les résultats n'ont montré aucune différence entre les groupes « HL-ARA/Véhicule » et « HL-ARA/D-galactose » après 4, 6 et 8 semaines d'administration de D-galactose. En revanche, après 6 et 8 semaines d'administration, des différences dans le nombre d'entrée des animaux dans les branches sont observées chez le groupe « HL-ARA/Véhicule » et « HL-ARA/D-galactose » comparés aux résultats de la semaine 4 (*Figure 62A, p.209*). En effet, après 6 et 8 semaines, les animaux ont présenté une augmentation du nombre d'entrée dans les bras du labyrinthe comparé à la 4ème semaine d'administration, ce qui traduit une plus grande activité locomotrice, sans qu'une diminution ou une augmentation du pourcentage d'alternance n'ait été observées (*Figure 62B, p.209*).

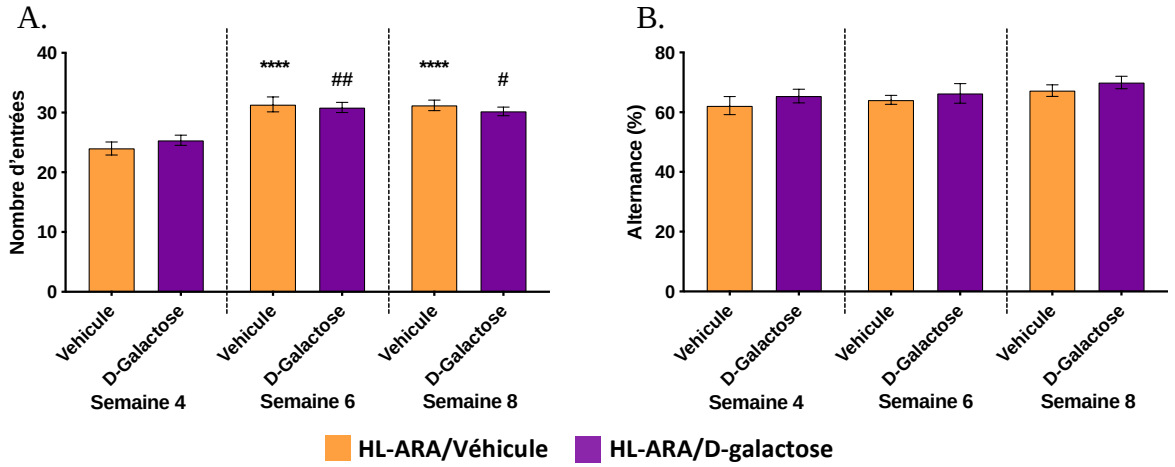


Figure 58 : Résultats du labyrinthe en Y après 4, 6 et 8 semaines d'administration du véhicule ou du D-galactose chez des animaux nourris avec le régime « HL-ARA ».

*(A) Le nombre d'entrées dans les branches du labyrinthe (B) Le pourcentage d'alternance (nombre d'alternance/(nombre d'entrée-2) ; exprimé en pourcentage). N=14 animaux/groupe après 4 et 6 semaines d'administration puis 9-10 après 8 semaines. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne±SEM. **** p-value<0,001 vs « HL-ARA/Vehicule » Semaine 4 ; # p-value<0,05 vs « HL-ARA/D-galactose » Semaine 4 et ## p-value<0,01 vs « HL-ARA/D-galactose » Semaine 4.*

c. Piscine de Morris

Afin de mesurer les capacités de mémoire à long terme, un test de la piscine de Morris a été réalisé. La latence d'atteinte de la plateforme lors des sessions d'apprentissage ainsi que la latence d'entrée dans le quadrant cible et la vitesse moyenne de nage ont été mesurées lors de la session de restitution. Les résultats des sessions d'apprentissage (*Figure 63A, p.210*) montrent une amélioration des compétences entre le premier et deuxième jour pour le groupe « HL-ARA/Véhicule ». En revanche, il n'y a plus d'amélioration pour ce groupe après le deuxième jour. Le groupe « HL-ARA/D-galactose » n'a présenté aucune amélioration de ses compétences entre le début des sessions d'apprentissage et le dernier jour.

Aucune différence statistique n'a été observée entre les deux groupes lors de la session de restitution (*Figure 63B, p.210*). De même, la vitesse de nage des animaux a été identique entre les deux groupes concernant la vitesse de nage, démontrant que les animaux passant le test ne présentent pas d'altération de leur capacité de nage (*Figure 63C, p.210*).

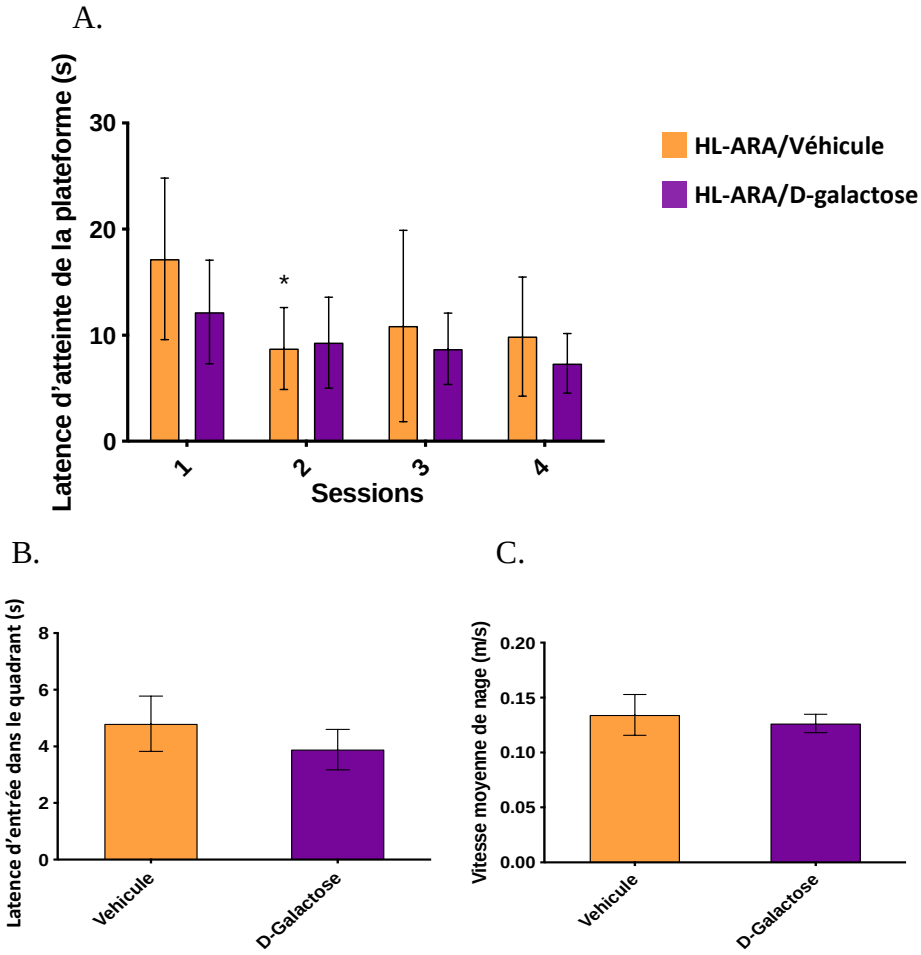


Figure 59 : Résultats de la piscine de Morris après 6 à 8 semaines d'administration du véhicule ou du D-galactose chez des animaux nourris avec le régime « HL-ARA ».

*(A) Latence d'atteinte de la plateforme lors des sessions d'apprentissage, (B) Latence d'entrée dans le quadrant de la plateforme lors de la restitution, (C) Vitesse moyenne de nage des animaux lors de la restitution. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne±SEM. N =9-10 animaux/groupe. * p-value<0,05 vs « HL-ARA/Vehicule » session 1.*

d. Openfield

Le test de l'openfield a été réalisé afin de mettre en évidence d'éventuelles altérations locomotrices et présence d'anxiété chez les animaux (*Figure 64, p.211*). L'ensemble des paramètres mesurés, à savoir la distance parcourue durant le test, celle parcourue dans la zone centrale et la latence de première entrée dans la zone centrale ainsi que le temps d'immobilité, le nombre d'épisodes d'immobilité et la vitesse moyenne des animaux dans le test ont été identiques dans les deux groupes expérimentaux (*Figure 64, p.211*).

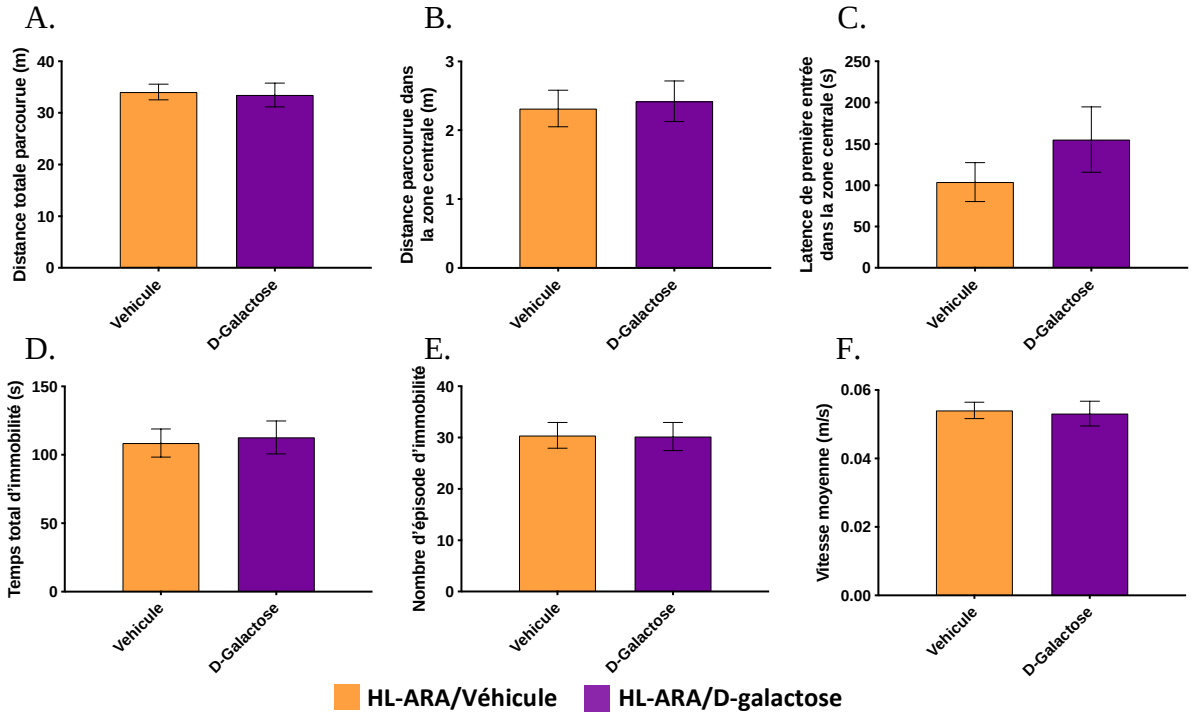


Figure 60 : Résultats du test de l'openfield après 6 semaines d'administration du véhicule ou du D-galactose chez des animaux nourris avec le régime « HL-ARA ».

(A) Distance totale parcourue par l'animal durant les 10 minutes de test, (B) Distance totale parcourue dans la zone centrale de l'openfield, (C) Latence de la première entrée dans la zone centrale, (D) Temps total d'immobilité, (E) Nombre d'épisode d'immobilité, (F) Vitesse moyenne durant le test de l'openfield. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne±SEM. N=14 animaux/groupe.

3. TBARS

Le dosage des TBARS réalisé sur des échantillons de plasma d'animaux nourris avec un régime « HL-ARA » et administré avec le véhicule ou le D-galactose n'a montré aucune différence entre les groupes « HL-ARA/Véhicule » et « HL-ARA/D-galactose » après 6 semaines et 8 semaines de traitement. Nous n'avons pas mis en évidence une augmentation du stress oxydant induit par l'ingestion de D-Galactose au moyen des hydrogels (*Figure 65, p.212*).

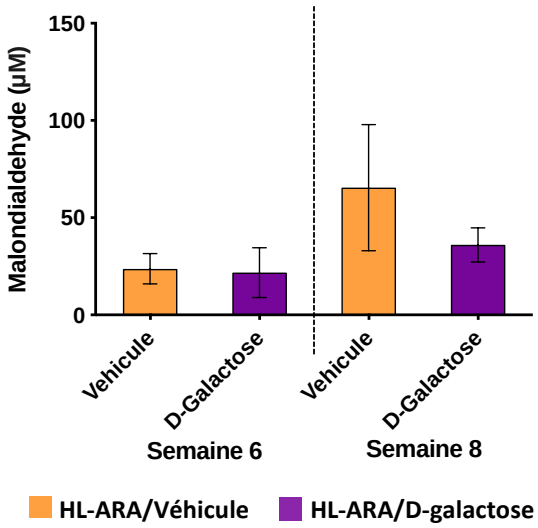


Figure 61 : Niveaux des TBARS plasmatiques chez des animaux nourris avec le régime « HL-ARA » et administrés avec le véhicule ou le D-Galactose dans l'Hydrogel® durant 6 et 8 semaines.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne±SEM. N=3 animaux/groupe après 6 semaines d'administration et N=10 animaux/groupe après 8 semaines d'administration.

IV. Discussion

Ces travaux visaient à déterminer les meilleures conditions pour tester *in vivo* les capacités des trois souches candidates *L. plantarum WCFS1*, *S. thermophilus CNRZ21* et *CNRZ160* à contrebalancer les effets d'un apport alimentaire en ARA et d'une induction d'un stress oxydant par le D-galactose. Nous avons mis au point l'ensemble des conditions de culture des trois souches candidates pour pouvoir utiliser les conditions les plus adéquates à notre problématique. Nous avons évalué la survie des bactéries probiotiques *in vitro* dans l'HydroGel® et *in vivo* dans le TGI de souris mâles BALB/cOlaHsd. Enfin nous avons testé l'efficacité d'un mode d'administration orale dans l'HydroGel® à induire un stress oxydant et une altération consécutive des capacités cognitives des souris mâles BALB/cOlaHsd. Nous discuterons ci-dessous les différents points.

A. Survie dans la matrice l'HydroGel® et le tractus gastro-intestinal

1. Expérimentations in vitro – Survie dans la matrice d'HydroGel®

Nous avons tout d'abord voulu optimiser la survie de ces bactéries dans le véhicule d'administration (HydroGel®) en présence de différents sucres afin de pouvoir envisager une

administration aux animaux toutes les 24h-48h. D'après les résultats obtenus dans cette étude (voir *Figure 59, p.204*), nous avons observé au bout de 48h après conception de l'HydroGel® une diminution de la concentration bactérienne de plus d'un logarithme en absence de lactose ou de glucose. En revanche, lorsque l'on ajoute du lactose ou bien même du glucose dans la matrice d'HydroGel®, la survie est optimisée, puisque la concentration bactérienne diminue de moins d'un logarithme, voire d'un logarithme tout au plus pour *S. thermophilus.* La concentration bactérienne semble même augmenter pour les bactéries *L. plantarum WCFS1*. Le fait d'utiliser du lactose dans la matrice d'administration se révèle nécessaire afin de permettre la survie des bactéries et constitue une suite logique de la préparation des cultures bactériennes.

En effet, le milieu de culture préférentiel des souches de *S. thermophilus* (qui sont des bactéries lactiques) contient du lactose pour une croissance optimale des bactéries. En ce qui concerne *L. plantarum*, son milieu de culture ne contient pas du lactose, mais du glucose. L'étude de Zhang a tout de même montré que *L. plantarum* avait la capacité de métaboliser le lactose lorsque le MRS *broth* était supplémenté en lactose. La croissance des bactéries se retrouvait même améliorée (Zhang *et al.*, 2020). Ce résultat de l'étude de Zhang, couplé à nos observations confortent le choix d'utiliser le lactose afin d'optimiser la survie des bactéries dans l'Hydrogel®.

2. Survie des bactéries dans le tractus gastro-intestinal de la souris BALB/cOlaHsd

Au cours de cette étude, nous avons validé la survie des bactéries dans le TGI de souris nourries avec un régime modérément hyperlipidique enrichi ou non en ARA. Nous avons en effet montré que les bactéries administrées aux souris étaient retrouvées vivantes dans les fèces à partir de t6h après mise en place de l'HydroGel® dans la cage. La concentration en bactéries dans les fèces diminue progressivement à partir de t6h jusqu'à t48h, pour les cultures fraîches et congelées.

La suite de cette étude pose la question de la colonisation de l'intestin par les bactéries administrées, puisqu'une bactérie colonisatrice se révèle plus intéressante sur le plan de la santé humaine. En effet, une bactérie probiotique colonisatrice présente un certain nombre d'avantages comme le fait d'induire des effets à plus long terme sans avoir besoin d'être de nouveau administrée par l'individu. A ce titre, plusieurs études ont montré que *L. plantarum WCFS1* est plus considérée comme une bactérie de passage qu'une bactérie colonisatrice de

l'intestin (van Bokhorst-van de Veen *et al.*, 2012 ; Elli *et al.*, 2006 ; Vesa *et al.*, 2000), à l'instar d'autres lactobacilles (Douillard & de Vos, 2014 ; Vesa *et al.*, 2000). Il est néanmoins important de notifier que dans cette étude, seule la lumière intestinale a été analysée, ce qui ne révèle que très peu d'informations sur la colonisation de l'épithélium intestinal. En ce qui concerne *S. thermophilus*, très peu de données à notre connaissance sont disponibles, et se concentrent majoritairement sur la souche *LMD-9* de *S. thermophilus*. Il a tout de même été montré que cette souche de *S. thermophilus* pouvait coloniser le TGI de rats *germ-free* (Ben-Yahia *et al.*, 2012; Rul *et al.*, 2011), et que le lactose possède une part importante dans la colonisation du TGI (Thomas *et al.*, 2011).

En revanche, notre étude a mis en évidence un certain nombre de limitations comme par exemple le faible nombre d'animaux et de données par animal qui ont limité la réalisation d'analyses statistiques. De plus, nous n'avons pas pu procéder à des prélèvements d'HydroGel® durant les différentes études à t0h, t6h, t24h, t48h afin d'en vérifier la concentration bactérienne. Afin de pouvoir comparer efficacement l'ensemble des données récoltées, il aurait été intéressant d'analyser la concentration bactérienne dans les HydroGels® en temps réel avec celleretrouvée dans les fèces des animaux. Ceci nous aurait permis de normaliser les données entre les groupes et d'identifier si la diminution de la concentration bactérienne observée dans les fèces est corrélée à une diminution des bactéries dans l'Hydrogel®. Ce mode d'administration ne nous permet pas non plus de standardiser la prise de bactéries probiotiques ni de déterminer avec précision la portion ingérée par chaque animal (qui sont regroupés par quatre dans les cages), d'autant plus lorsqu'une relation de dominance s'installe entre les animaux. En effet, le dominant a un accès plus important à la nourriture et à la matrice d'HydroGel® qui servait également d'apport hydrique durant l'étude.

En conclusion, la survie des bactéries dans le TGI des souris BALB/cOlaHsd mâles est validée de t6h à t48h après incorporation des HydroGels® dans la cage. Des données supplémentaires sont requises afin de pouvoir réaliser une étude statistique sur les différentes comparaisons : cinétique, régime et conservation des cultures. L'analyse de la muqueuse colique que nous avons prélevée (mais que nous n'avons pu étudier faute de temps et en raison de la crise sanitaire) pourrait également apporter un début de réponse quant à l'installation des différentes bactéries dans le colon des animaux.

B. Mise en place d'un modèle de vieillissement précoce

Dans cette étude, nous n'avons pas observé d'altération du comportement entre 6 et 8 semaines d'ingestion de D-galactose (250 mg.kg^{-1}.jour^{-1}), ni d'augmentation des TBARS, bien que la littérature montre des effets pour des doses de 100 et 200 mg.kg^{-1}.jour^{-1} de D-galactose par voie sous cutanées et intrapéritonéales (*tableau 2 p.51*) (Budni *et al.,* 2016; Chogtu *et al.,* 2018; Jiang *et al.,* 2019).

Cette absence de stress oxydant et d'altération du comportement peut s'expliquer par un problème de dose et/ou de durée d'administration. En effet, bien que les doses d'administrations varient entre 100 et 200 mg.kg^{-1}.jour^{-1}, certaines études peuvent aller jusqu'à 1,2 g.kg^{-1}.jour^{-1} par injection sous-cutanée ou intrapéritonéale (Zhang *et al.,* 2018; Zhao *et al.,* 2018). Outre la diversité de doses d'administration, la littérature montre également des durées d'administration diverses, allant de 30 jours (Garcez *et al.,* 2018; Peng *et al.,* 2014) à 6 ou 8 semaines (Chogtu *et al.,* 2018; Ho *et al.,* 2019; Jiang *et al.,* 2019; Zhao *et al.,* 2018). Néanmoins, des modifications du comportement (altération des capacités de mémoire à court et long terme) ou du stress oxydant (évalué par les TBARS) ont été retrouvées dans ces études malgré les différences de durée d'administration.

Une seconde explication possible de nos résultats pourrait être le mode d'administration orale du D-galactose. D'autres études précliniques utilisant ce mode d'administration ont démontré des effets sur le comportement et le stress oxydant. Ainsi, les travaux de Budni et Chogtu utilisant la méthode de gavage chez le rat (100 à 200 mg. kg^{-1}.jour^{-1}) conduisent à des altérations mnésiques (Budni *et al.,* 2016; Chogtu *et al.,* 2018) et une augmentation de la concentration en TBARS dans les hippocampes et le cortex pré-frontal (Budni *et al.,* 2016). Plusieurs autres études ont rapporté des résultats similaires sur les capacités cognitives et le niveau de stress oxydant en administrant le D-galactose dans l'eau de boisson (200 mg.kg^{-1} dans 20 mL ou 500 mg.kg^{-1} dans 10 mL) (Fatemi *et al.,* 2018; Ghanbari *et al.,* 2012; Krzysztoforska *et al.,* 2019). En revanche, Salkovic-Petrisic et ses collaborateurs (Salkovic-Petrisic *et al.,* 2014) ont au contraire décrit un rôle protecteur du D-galactose administré oralement contre la neurotoxicité de la streptozotocine injectée dans les ventricules cérébraux. Pour expliquer l'absence de stress oxydant, ces auteurs ont postulé que l'administration orale de D-galactose entrainerait une augmentation de la galactosémie plus modérée (7 fois inférieure) et plus lente que l'injection intrapéritonéale, ce qui amoindrirait le flux intracérébral, limitant de ce fait la création d'un stress oxydant. Dans le même registre, l'étude de Stahel a

conclu qu'un régime à faible teneur en D-galactose (15%) améliorait la sensibilité hépatique à l'insuline, tandis qu'un régime très riche (supérieur à 30%) induisait une hypergalactosémie et des symptômes de diabète (Stahel *et al.*, 2017).

Enfin, nous avons choisi d'utiliser le régime « HL-ARA » car il constitue un meilleur contrôle vis-à-vis du régime « HL+ARA » que le régime standard grâce à sa proportion sensiblement identique en lipides, ce qui permet d'évaluer directement les effets d'un enrichissement lipidique sur nos animaux. Nos précédents résultats ont montré que le régime « HL-ARA » modifie le microbiote fécal en augmentant la présence de l'espèce bactérienne *Bifidobacterium pseudolongum* et en diminuant celle des *Escherichia-Shigella* (se référer aux résultats présentés dans le *Chapitre 4* de ce manuscrit). L'absence d'effet observée sur le comportement et le dosage des TBARS pourrait être due aux capacités anti-oxydantes de l'espèce bactérienne *Bifidobacterium pseudolongum* identifiée dans le microbiote fécal des animaux nourris avec le régime « HL-ARA » car en effet, le modèle que nous avons utilisé repose sur l'établissement d'un stress oxydant chez l'animal (Budni *et al.*, 2016; Delwing-de Lima *et al.*, 2017). En revanche, une étude réalisée par Vasquez et ses collaborateurs en 2009 a révélé que la souche de bactérie *Bifidobacterium pseudolongum Patronus*, administrée quotidiennement à des rats Wistar par voie orale sur une semaine permet de diminuer le stress oxydant (dosage du MDA et du glutathion) présent dans le colon et le petit intestin comparé au groupe contrôle ou au groupe traité avec un antibiotique, le Metronidazole (Vasquez *et al.*, 2009). Enfin, une dernière hypothèse que nous ne pouvons écarter concerne la présence de *Bifidobacterium pseudolongum* dans le microbiote des animaux qui a pu inhiber les effets de notre modèle de D-galactose et/ou réduire son absorption intestinale. L'inhibition des effets oxydants du D-galactose à partir de l'intestin et du colon pourrait donc se traduire par l'absence d'effets sur le comportement des animaux ainsi que dans le dosage des TBARS.

C. Conclusion

Dans ce chapitre 5, nous avons donc pu valider la survie des bactéries probiotiques jusqu'à 24-48h en milieu gélosé HydroGel® et dans le TGI. Nous avons également évalué les effets de l'administration orale du D-galactose dans l'HydroGel®, ce qui pouvait par la suite constituer un mode d'administration moins invasif (des probiotiques et du D-galactose) et alternatif aux injections sous cutanées/intrapéritonéales et aux gavages quotidiens. Enfin, l'évaluation de la cinétique des modifications des capacités mnésiques au cours des différentes

semaines de protocole avait pour objectif d'optimiser la fenêtre d'administration du D-galactose. Cependant, il s'est avéré aux vues des différents tests de comportements que notre protocole n'induit pas d'altération des capacités de mémoire à court et long terme ni de modification des niveaux de stress oxydant dans le compartiment plasmatique. Il serait donc nécessaire, pour exclure définitivement ce mode d'administration orale du D-galactose, de ré-évaluer les doses et la durée du traitement en mesurant en parallèle la biodisponibilité sanguine et cérébrale du D-galactose. Ces résultats devront être complétés avec des données sur l'administration des régimes « Std-ARA » et « HL+ARA » ainsi que d'une analyse du microbiote fécal.

Ce travail de thèse qui devait comprendre une analyse des capacités des probiotiques à combattre la synergie entre consommation alimentaire d'ARA et la MA nécessite donc des analyses préliminaires plus poussées afin de comparer les modes d'administration orale de D-galactose et l'injection sous-cutanée ou intrapéritonéale. Les suggestions de protocoles complémentaires énoncées précédemment durant cette discussion sont donc indispensables avant de pouvoir énoncer des conclusions viables et pertinentes.

Conclusion générale.

“Vous savez ce que c’est que la recherche : on part sur une question et on trouve en cours de route des faits qui vous en posent une autre.”

Philippe Meyer, Journaliste et Ecrivain

Les AGs de la série ω-6 composent une part croissante des lipides alimentaires des populations humaines notamment dans les pays occidentaux. Au-delà du rôle complexe de son précurseur l'AL (qui représente la majeure partie des ω-6 d'origine végétale), la part de l'ARA dans l'alimentation humaine et ses effets sont mal évalués, bien que l'ARA soit le principal AGPI ω-6 dans les lipides membranaires des mammifères et qu'il puisse être converti en de nombreux eicosanoïdes jouant un rôle important dans l'inflammation. En particulier, des travaux de notre laboratoire et d'autres équipes ont montré que la libération de l'ARA des phospholipides neuronaux par la PLA_2 cytosolique est critique pour la neurotoxicité des peptides Aβ. En outre, un travail plus récent de l'équipe du Pr. Olivier a montré qu'un régime contenant 1% d'ARA administré pendant 12 semaines sensibilise des souris à la neurotoxicité des oligomères de peptides Aβ injectés en dose unique dans les ventricules cérébraux (Thomas *et al.,* 2017). Dans cette étude menée par Thomas et ses collaborateurs, les mécanismes qui pourraient expliquer l'impact de l'apport alimentaire d'ARA sur la sensibilité du cerveau à la neurotoxicité des peptides Aβ n'ont pas été totalement investigués. Nous avons évalué, dans ce présent travail de thèse, les effets d'un apport alimentaire en ARA sur le microbiote, l'intestin et sa communication avec le cerveau.

Nous avons donc montré que l'apport alimentaire en ARA modifie le microbiote fécal par rapport à un régime murin conventionnel (5% de lipides) et à un régime qui comporte un pourcentage plus important de lipides (15% de lipides) et un profil lipidique identiques (30% d'AL). Une consommation d'un régime enrichi en ARA favorise ainsi le genre bactérien *Escherichia-Shigella* (ayant une activité pro-inflammatoire) et diminue l'espèce *Bifidobacterium pseudolongum* qui impacte positivement les états inflammatoires et participe au développement d'autres espèces microbiennes à valeur positive pour l'hôte. Cette modification du microbiote est associée à une augmentation des niveaux d'expression génique de 11 et 3 fois de l'IL-1β et du TNFα dans le colon, ainsi que ceux du TNFα supérieurs à 10 fois dans le tissu adipeux mésentérique par rapport au groupe « Std-ARA ». Nous avons également observé des altérations mineures et transitoires des niveaux d'expression des constituants des jonctions serrées coliques qui traduiraient des modifications de l'intégrité de la barrière intestinale ainsi que ceux des cytokines hépatiques. L'ensemble de ces résultats vont dans le sens de la création d'un état sub-inflammatoire par l'apport alimentaire d'ARA. Cette conclusion mériterait d'être confirmée par des explorations complémentaires sur les mécanismes d'action de l'ARA sur le microbiote et la muqueuse intestinale, la production et le passage de matériels bactériens ainsi que les effets métaboliques de cet apport qui n'ont pu être réalisés dans le temps de la thèse.

L'existence d'un état sub-inflammatoire systémique peut favoriser la survenue d'une neuroinflammation et la progression de la MA. Nous avons observé une augmentation d'expression du marqueur astrocytaire GFAP dans le cortex et les hippocampes des animaux nourris 9 semaines avec le régime enrichi en ARA, sans modification du marqueur microglial Iba1. Nous avons également mis en évidence une diminution d'expression des cytokines pro-inflammatoires plutôt qu'une augmentation dans l'ensemble du cerveau. Ces résultats sont en cohérence avec les résultats antérieurs du laboratoire (Thomas *et al.*, 2017) qui montraient l'absence d'altération cognitive chez les souris nourries avec le régime riche en ARA en absence de stimulus inducteur d'un phénotype Alzheimer, bien que des modifications d'expression du marqueur synaptique PSD-95 et de certains récepteurs AMPA ont été observées. Seul l'application d'un stimulus pro-Alzheimer par injection ICV d'oligomères de peptides Aβ avait amené à l'observation d'altérations des capacités cognitives et d'une neuroinflammation (*Figure 66, p.222*).

Plutôt que l'injection ICV de peptides Aβ critiquée antérieurement pour son caractère aigu et massif, nous avons privilégié le recours à un modèle d'administration de D-galactose. Selon de très nombreuses études ce modèle induit des altérations cognitives et un vieillissement accéléré (et pour certaines une fibrillation intracérébrale de peptides Aβ avec apparition de plaques amyloïdes) par induction d'un stress oxydant important. L'existence d'un stress oxydant cérébral est un trait physiopathologique de la MA avec la neuroinflammation, l'accumulation de peptides Aβ et l'hyperphosphorylation de la protéine tau. Pour des raisons d'éthique animale et par la suite pour envisager une administration conjointe du D-galactose et des probiotiques, nous avons cherché à tester une administration orale innovante du D-galactose dans l'eau de boisson apportée sous forme d'Hydrogels®. Malheureusement, nous n'avons pas constaté d'émergence d'un stress oxydant, ni d'altération du comportement dans ces conditions, soit pour des raisons de doses, de durée ou encore de mode d'administration, soit parce que le régime alimentaire que nous avons employé dans cette étude, le régime « HL-ARA » stimule la croissance de *Bifidobacterium pseudolongum*, espèce diminuant les états inflammatoires chez l'hôte. Afin de valider ces hypothèses, de nouveaux essais sont en cours au laboratoire en employant une administration sous cutanée de D-galactose en condition des différents régimes alimentaires « Std-ARA », « HL-ARA » et « HL+ARA ».

La MA est une maladie neurodégénérative qui constitue un problème de santé majeur dans le monde, y compris dans les pays à faibles et moyens revenus et il n'existe actuellement aucun traitement efficace commercialisé en France. En revanche, aux Etats-Unis, la *Food and Drug Administration* a approuvé la mise sur le marché d'un nouveau traitement, ADUHELM

ou Aducanumab, comme première immunothérapie ayant pour but de moduler les processus biologiques de la MA. L'emploi de cet anticorps a permis de ralentir le déclin cognitif chez des personnes atteintes de MCI et de MA aux prémices de la maladie (Dunn *et al*., 2021). La conception et l'application de stratégies préventives capables de repousser l'âge de survenue de la MA et de diminuer sa prévalence dans le monde sont indispensables à côté de la production de thérapies pour toutes les populations touchées. Nos résultats complétés par ceux antérieurs du laboratoire appellent à prêter attention à la consommation d'AGPIs ω- 6 et tout particulièrement d'ARA, des aliments qui les contiennent, comme la viande animale (Pinchaud *et al.,* 2018). Par ailleurs, nos résultats soutiennent l'hypothèse que le régime « HL+ARA » constitue un modèle de dysbiose intestinale et d'établissement d'une sub-inflammation systémique contre lesquelles des bactéries probiotiques aux propriétés anti-inflammatoires pourraient avoir un effet bénéfique. L'évaluation de ces effets bénéfiques faisait partie des objectifs initiaux de cette thèse. Nous avons commencé à examiner la survie dans le TGI de deux souches de *Sterptococcus thermophilus* dont les travaux du laboratoire ont montré les activités anti-inflammatoires *in vitro* et une souche de *Lactobacillus plantarum* qui métabolise les AGPIs ω-6 en AGs conjugués. Une étude est en cours de réalisation dans le cadre d'un stage de M2, afin de mettre en évidence les effets des probiotiques sur l'administration conjointe d'ARA et de D-galactose qui pourrait venir compléter ce présent travail de thèse dans un futur proche.

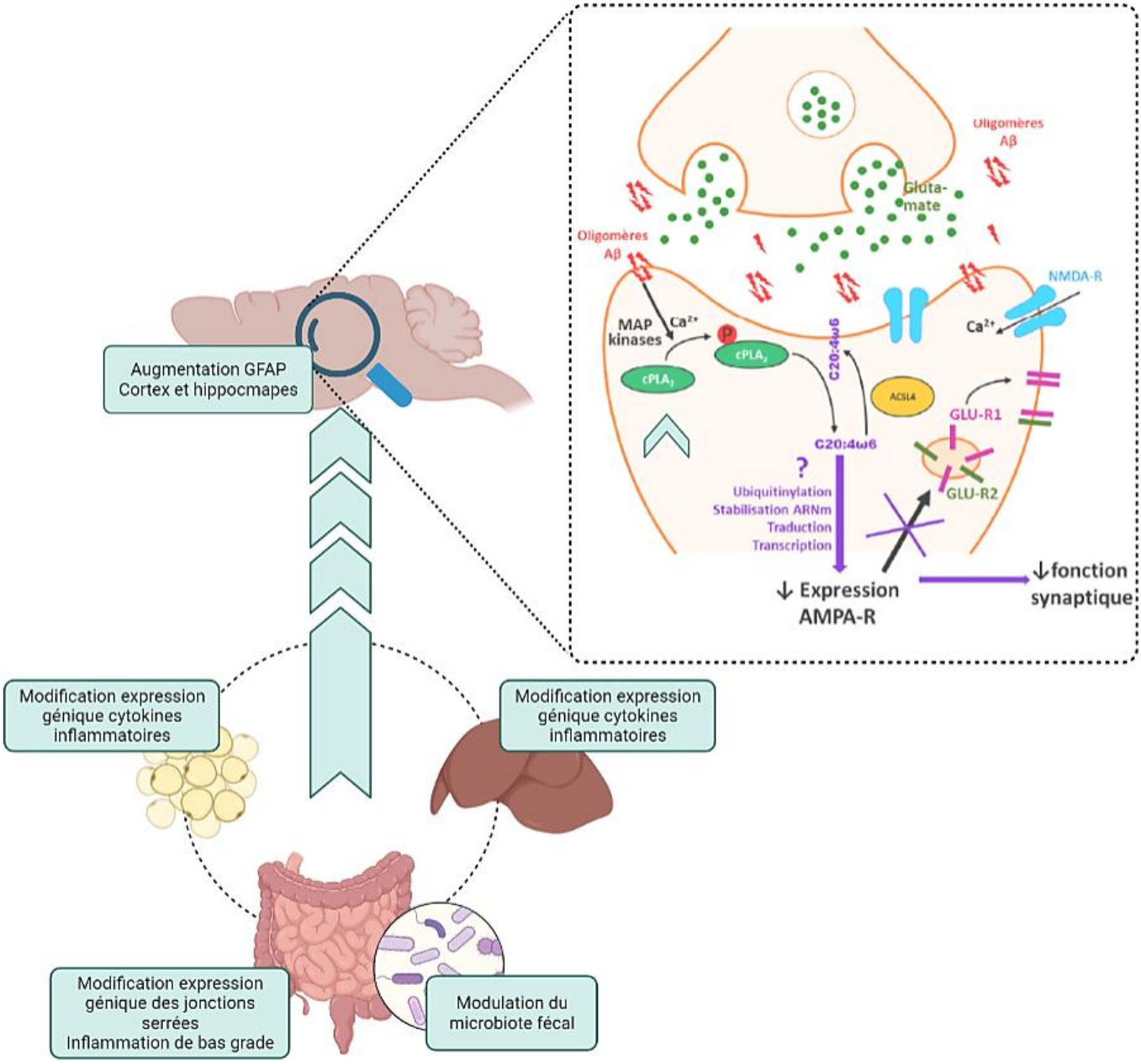


Figure 62 : Effets périphérique et central de l'ARA et implication dans les fonctions synaptiques.

Figure réalisée avec Biorender et à partir des résultats de cette thèse et de l'étude de Thomas et al., 2017. Aβ : peptides β amyloïde ; ACSL4 : acyl-CoA synthétase 4 ; AMPA-R : récepteurs alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic au glutamate ; C20:4 ω6 : acide arachidonique ; GLU-R : sous-unités des AMPA-R ; MAP kinase : Mitogen-Activated Protein Kinases ; NMDA-R : récepteur N-methyl-D-aspartate au glutamate.

Bibliographie.

“La bibliographie se fait après et non avant d’aborder un sujet de recherche.”

Jean Perrin, Physicien et Ecrivain français

Aarts, E., Ederveen, T. H. A., Naaijen, J., Zwiers, M. P., Boekhorst, J., Timmerman, H. M., Smeekens, S. P., Netea, M. G., Buitelaar, J. K., Franke, B., van Hijum, S. A. F. T., & Arias Vasquez, A. (2017). Gut microbiome in ADHD and its relation to neural reward anticipation. *PLOS ONE*, *12*(9), e0183509. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183509

Abbatecola, A. M., Russo, M., & Barbieri, M. (2018). Dietary patterns and cognition in older persons. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, *21*(1), 10-13. https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000434

Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, *37*(1), 13-25. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030

Ackman, R. G. (1998). Remarks on official methods employing boron trifluoride in the preparation of methyl esters of the fatty acids of fish oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *75*(4), 541-545. https://doi.org/10.1007/s11746-998-0263-9

Acosta, P. B., & Gross, K. C. (1995). Hidden sources of galactose in the environment. *European Journal of Pediatrics*, *154*(7 Suppl 2), S87-92. https://doi.org/10.1007/BF02143811

Aguirre, M., Eck, A., Koenen, M. E., Savelkoul, P. H. M., Budding, A. E., & Venema, K. (2016). Diet drives quick changes in the metabolic activity and composition of human gut microbiota in a validated in vitro gut model. *Research in Microbiology*, *167*(2), 114-125. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.09.006

Agus, A., Planchais, J., & Sokol, H. (2018). Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host & Microbe*, *23*(6), 716-724. https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.003

Ahima, R. S., & Flier, J. S. (2000). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *11*(8), 327-332. https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00301-5

Ahmad, M. H., Fatima, M., & Mondal, A. C. (2019). Influence of microglia and astrocyte activation in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease : Rational insights for the therapeutic approaches. *Journal of Clinical Neuroscience*, *59*, 6-11. https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.10.034

Aïd, S., & Bosetti, F. (2011). Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation : Therapeutic implications. Biochimie, 93(1), 46 51. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.09.009

Ailhaud, G., & Guesnet, P. (2004). Fatty acid composition of fats is an early determinant of childhood obesity : A short review and an opinion. *Obesity Reviews*, *5*(1), 21-26. https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2004.00121.x

Akitake, Y., Nakatani, Y., Kamei, D., Hosokawa, M., Akatsu, H., Uematsu, S., Akira, S., Kudo, I., Hara, S., & Takahashi, M. (2013). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is induced in alzheimer's disease, and its deletion mitigates alzheimer's disease-like pathology in a mouse model. *Journal of Neuroscience Research*, *91*(7), 909-919. https://doi.org/10.1002/jnr.23217

Alford, S., Patel, D., Perakakis, N., & Mantzoros, C. S. (2018, février 1). *Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease : Weighing the evidence*. Obesity Reviews. https://doi.org/10.1111/obr.12629

Alkasir, R., Li, J., Li, X., Jin, M., & Zhu, B. (2017). Human gut microbiota : The links with dementia development. *Protein & Cell*, *8*(2), 90-102. https://doi.org/10.1007/s13238-016-0338-6

Alzheimer's Association. (2021). 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, *17*(3), 327-406. https://doi.org/10.1002/alz.12328

Amor, S., Puentes, F., Baker, D., & Valk, P. V. D. (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*, *129*(2), 154-169. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03225.x

Amtul, Z., Uhrig, M., Wang, L., Rozmahel, R. F., & Beyreuther, K. (2012). Detrimental effects of arachidonic acid and its metabolites in cellular and mouse models of Alzheimer's disease : Structural insight. *Neurobiology of Aging*, *33*(4), 831.e21-831.e31. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.07.014

Ananthakrishnan, A. N., Bernstein, C. N., Iliopoulos, D., Macpherson, A., Neurath, M. F., Ali, R. A. R., Vavricka, S. R., & Fiocchi, C. (2018). Environmental triggers in IBD : A review of progress and evidence. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *15*(1), 39-49. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.136

Anoop, A., Singh, P. K., Jacob, R. S., & Maji, S. K. (2010). CSF Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *International Journal of Alzheimer's Disease*, *2010*. https://doi.org/10.4061/2010/606802

Antoniades, C., Bakogiannis, C., Tousoulis, D., Antonopoulos, A. S., & Stefanadis, C. (2009). The CD40/CD40 Ligand System. *Journal of the American College of Cardiology*, *54*(8), 669-677. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.03.076

Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory : Neurobiology, test procedure, and its modifications. Cognitive Processing, 13(2), 93-110. https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z

Arai, H., Lee, V. M., Messinger, M. L., Greenberg, B. D., Lowery, D. E., & Trojanowski, J. Q. (1991). Expression patterns of beta-amyloid precursor protein (beta-APP) in neural and nonneural human tissues from Alzheimer's disease and control subjects. *Annals of Neurology*, *30*(5), 686-693. https://doi.org/10.1002/ana.410300509

Aridi, Y. S., Walker, J. L., & Wright, O. R. L. (2017). The Association between the Mediterranean Dietary Pattern and Cognitive Health : A Systematic Review. *Nutrients*, *9*(7), 674. https://doi.org/10.3390/nu9070674

Arnoldussen, I. a. C., Wiesmann, M., Pelgrim, C. E., Wielemaker, E. M., van Duyvenvoorde, W., Amaral-Santos, P. L., Verschuren, L., Keijser, B. J. F., Heerschap, A., Kleemann, R., Wielinga, P. Y., & Kiliaan, A. J. (2017). Butyrate restores HFD-induced adaptations in brain function and metabolism in mid-adult obese mice. *International Journal of Obesity*, *41*(6), 935-944. https://doi.org/10.1038/ijo.2017.52

Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., Coffer, P. J., & Rudensky, A. Y. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, *504*(7480), 451-455. https://doi.org/10.1038/nature12726

Arvanitakis, Z., Wilson, R. S., Bienias, J. L., Evans, D. A., & Bennett, D. A. (2004). Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Archives of Neurology*, *61*(5), 661-666. https://doi.org/10.1001/archneur.61.5.661

Athan, E. S., Williamson, J., Ciappa, A., Santana, V., Romas, S. N., Lee, J. H., Rondon, H., Lantigua, R. A., Medrano, M., Torres, M., Arawaka, S., Rogaeva, E., Song, Y. Q., Sato, C., Kawarai, T., Fafel, K. C., Boss, M. A., Seltzer, W. K., Stern, Y., … Mayeux, R. (2001). A founder mutation in presenilin 1 causing early-onset Alzheimer disease in unrelated Caribbean Hispanic families. *JAMA*, *286*(18), 2257-2263. https://doi.org/10.1001/jama.286.18.2257

Babior, B. M. (2000a). Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, *109*(1), 33-44. https://doi.org/10.1016/s0002-9343(00)00481-2

Babior, B. M. (2000b). The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life*, *50*(4-5), 267-269. https://doi.org/10.1080/713803730

Badawy, A. A.-B. (2017). Tryptophan availability for kynurenine pathway metabolism across the life span : Control mechanisms and focus on aging, exercise, diet and nutritional supplements. *Neuropharmacology*, *112*, 248-263. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.11.015

Baddeley, A. (1981). The concept of working memory : A view of its current state and probable future development. *Cognition*, *10*(1-3), 17-23. https://doi.org/10.1016/0010-0277(81)90020-2

Bahlouli, W., Breton, J., Lelouard, M., L'Huillier, C., Tirelle, P., Salameh, E., Amamou, A., Atmani, K., Goichon, A., Bôle-Feysot, C., Ducrotté, P., Ribet, D., Déchelotte, P., & Coëffier, M. (2020). Stress-induced intestinal barrier dysfunction is exacerbated during diet-induced obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *81*, 108382. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108382

Baker, L. D., Cross, D. J., Minoshima, S., Belongia, D., Watson, G. S., & Craft, S. (2011). Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with prediabetes or early type 2 diabetes. *Archives of Neurology*, *68*(1), 51-57. https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.225

Baptista, L. C., Sun, Y., Carter, C. S., & Buford, T. W. (2020). Crosstalk Between the Gut Microbiome and Bioactive Lipids : Therapeutic Targets in Cognitive Frailty. *Frontiers in Nutrition*, *7*. https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00017

Barage, S. H., & Sonawane, K. D. (2015). Amyloid cascade hypothesis : Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, *52*, 1-18. https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008

Baranello, R. J., Bharani, K. L., Padmaraju, V., Chopra, N., Lahiri, D. K., Greig, N. H., Pappolla, M. A., & Sambamurti, K. (2015). Amyloid-Beta Protein Clearance and Degradation (ABCD) Pathways and their Role in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*, *12*(1), 32-46.

Barger, S. W., & Mattson, M. P. (1996). Induction of neuroprotective κB-dependent transcription by secreted forms of the Alzheimer's β-amyloid precursor. *Molecular Brain Research*, *40*(1), 116-126. https://doi.org/10.1016/0169-328X(96)00036-8

Barnham, K. J., McKinstry, W. J., Multhaup, G., Galatis, D., Morton, C. J., Curtain, C. C., Williamson, N. A., White, A. R., Hinds, M. G., Norton, R. S., Beyreuther, K., Masters, C. L., Parker, M. W., & Cappai, R. (2003). Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. A regulator of neuronal copper homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(19), 17401-17407. https://doi.org/10.1074/jbc.M300629200

Bazan, N. G., Packard, M. G., Teather, L., & Allan, G. (1997). Bioactive lipids in excitatory neurotransmission and neuronal plasticity. *Neurochemistry International*, *30*(2), 225-231. https://doi.org/10.1016/s0197-0186(96)00020-4

Bazzoni, G., & Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions : Molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological Reviews*, *84*(3), 869-901. https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2003

Beiroa, D., Romero-Picó, A., Langa, C., Bernabeu, C., López, M., López-Novoa, J. M., Nogueiras, R., & Diéguez, C. (2013). Heterozygous Deficiency of Endoglin Decreases Insulin and Hepatic Triglyceride Levels during High Fat Diet. *PLoS ONE*, *8*(1), e54591. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054591

Belkaid, Y., & Harrison, O. J. (2017). Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity*, *46*(4), 562-576. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.008

Bell, R. D., & Zlokovic, B. V. (2009). Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, *118*(1), 103-113. https://doi.org/10.1007/s00401-009-0522-3

Belury, M. A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health : Physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, *22*, 505-531. https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.021302.121842

Benn, S. C., & Woolf, C. J. (2004). Adult neuron survival strategies—Slamming on the brakes. *Nature Reviews. Neuroscience*, *5*(9), 686-700. https://doi.org/10.1038/nrn1477

Benoit, B., Laugerette, F., Plaisancié, P., Géloën, A., Bodennec, J., Estienne, M., Pineau, G., Bernalier-Donadille, A., Vidal, H., & Michalski, M.-C. (2015). Increasing fat content from 20 to 45 wt% in a complex diet induces lower endotoxemia in parallel with an increased number of intestinal goblet cells in mice. *Nutrition Research*, *35*(4), 346-356. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.01.005

Ben-Yahia, L., Mayeur, C., Rul, F., & Thomas, M. (2012). Growth advantage of Streptococcus thermophilus over Lactobacillus bulgaricus in vitro and in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. *Beneficial microbes*, *3*, 211-219. https://doi.org/10.3920/BM2012.0012

Berendsen, A. A. M., Kang, J. H., Rest, O. van de, Feskens, E. J. M., Groot, L. C. P. G. M. de, & Grodstein, F. (2017). The Dietary Approaches to Stop Hypertension Diet, Cognitive Function, and Cognitive Decline in American Older Women. *Journal of the American Medical Directors Association*, *18*(5), 427-432. https://doi.org/10.1016/j.jamda.2016.11.026

Berry, G. T. (1993). Classic Galactosemia and Clinical Variant Galactosemia. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, G. Mirzaa, & A. Amemiya (Éds.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1518/

Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J., & Fernandes, G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *17*(12), 789-810. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.02.009

Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.-D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., & Wells, J. M. (2014). Intestinal permeability—A new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*, *14*, 189. https://doi.org/10.1186/s12876-014-0189-7

Blasbalg, T. L., Hibbeln, J. R., Ramsden, C. E., Majchrzak, S. F., & Rawlings, R. R. (2011). Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *93*(5), 950-962. https://doi.org/10.3945/ajcn.110.006643

Bleich, A., & Hansen, A. K. (2012). Time to include the gut microbiota in the hygienic standardisation of laboratory rodents. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *35*(2), 81-92. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.006

Blüher, M., & Mantzoros, C. S. (2015). From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism*, *64*(1), 131-145. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.016

Bo, T., Wen, J., Zhao, Y., Tian, S., Zhang, X., & Wang, D. (2020). Bifidobacterium pseudolongum reduces triglycerides by modulating gut microbiota in mice fed high-fat food. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *198*, 105602. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105602

Bomfim, T. R., Forny-Germano, L., Sathler, L. B., Brito-Moreira, J., Houzel, J.-C., Decker, H., Silverman, M. A., Kazi, H., Melo, H. M., McClean, P. L., Holscher, C., Arnold, S. E., Talbot, K., Klein, W. L., Munoz, D. P., Ferreira, S. T., & De Felice, F. G. (2012). An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease- associated Aβ oligomers. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(4), 1339-1353. https://doi.org/10.1172/JCI57256

Bondi, M. W., Monsch, A. U., Butters, N., Salmon, D. P., & Paulsen, J. S. (1993). Utility of a modified version of the wisconsin card sorting test in the detection of dementia of the alzheimer type. *The Clinical Neuropsychologist*, *7*(2), 161-170. https://doi.org/10.1080/13854049308401518

Bonfili, L., Cecarini, V., Berardi, S., Scarpona, S., Suchodolski, J. S., Nasuti, C., Fiorini, D., Boarelli, M. C., Rossi, G., & Eleuteri, A. M. (2017). Microbiota modulation counteracts Alzheimer's disease progression influencing neuronal proteolysis and gut hormones plasma levels. *Scientific Reports*, *7*(1), 2426. https://doi.org/10.1038/s41598-017-02587-2

Bonfili, L., Cecarini, V., Gogoi, O., Gong, C., Cuccioloni, M., Angeletti, M., Rossi, G., & Eleuteri, A. M. (2021). Microbiota modulation as preventative and therapeutic approach in Alzheimer's disease. *The FEBS Journal*, *288*(9), 2836-2855. https://doi.org/10.1111/febs.15571

Bostanciklioğlu, M. (2019). The role of gut microbiota in pathogenesis of Alzheimer's disease. Journal of Applied Microbiology, 127(4), 954-967. https://doi.org/10.1111/jam.14264

Bottacini, F., Ventura, M., van Sinderen, D., & O'Connell Motherway, M. (2014). Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories*, *13*(1), S4. https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S4

Bouleau, S., & Tricoire, H. (2015). Drosophila Models of Alzheimer's Disease: Advances, Limits, and Perspectives. *Journal of Alzheimer's Disease*, *4*, 1015-1038. https://doi.org/10.3233/JAD-142802

Bozan, B., & Temelli, F. (2008). Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource Technology*, *99*(14), 6354-6359. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.009

Braidy, N., Poljak, A., Jayasena, T., Mansour, H., Inestrosa, N. C., & Sachdev, P. S. (2015). Accelerating Alzheimer's research through 'natural' animal models. *Current Opinion in Psychiatry*, *28*(2), 155-164. https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000137

Brake, D. K., Smith, E. O., Mersmann, H., Smith, C. W., & Robker, R. L. (2006). ICAM-1 expression in adipose tissue: Effects of diet-induced obesity in mice. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *291*(6), C1232-1239. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00008.2006

Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Ng, L. G., Guan, N. L., Kundu, P., Gulyás, B., Halldin, C., Hultenby, K., Nilsson, H., Hebert, H., Volpe, B. T., Diamond, B., & Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine*, *6*(263), 263ra158. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759

Breit, S., Kupferberg, A., Rogler, G., & Hasler, G. (2018). Vagus Nerve as Modulator of the Brain–Gut Axis in Psychiatric and Inflammatory Disorders. *Frontiers in Psychiatry*, *9*. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2018.00044

Brightman, M. W., & Reese, T. S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *The Journal of Cell Biology*, *40*(3), 648-677. https://doi.org/10.1083/jcb.40.3.648

Britanova, L., & Diefenbach, A. (2017). Interplay of innate lymphoid cells and the microbiota. *Immunological Reviews*, *279*(1), 36-51. https://doi.org/10.1111/imr.12580

Brown, A. J., Goldsworthy, S. M., Barnes, A. A., Eilert, M. M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A. I., Wigglesworth, M. J., Kinghorn, I., Fraser, N. J., Pike, N. B., Strum, J. C., Steplewski, K. M., Murdock, P. R., Holder, J. C., Marshall, F. H., Szekeres, P. G., Wilson, S., Ignar, D. M., … Dowell, S. J. (2003a). The Orphan G Protein-coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain

Carboxylic Acids *. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(13), 11312-11319. https://doi.org/10.1074/jbc.M211609200

Brown, W. J., Chambers, K., & Doody, A. (2003b). Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: Mediators of membrane shape and function. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *4*(4), 214-221. https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00078.x

Brun, P., Gobbo, S., Caputi, V., Spagnol, L., Schirato, G., Pasqualin, M., Levorato, E., Palù, G., Giron, M. C., & Castagliuolo, I. (2015). Toll like receptor-2 regulates production of glial-derived neurotrophic factors in murine intestinal smooth muscle cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *68*, 24-35. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.03.018

Budni, J., Pacheco, R., da Silva, S., Garcez, M. L., Mina, F., Bellettini-Santos, T., de Medeiros, J., Voss, B. C., Steckert, A. V., Valvassori, S. da S., & Quevedo, J. (2016). Oral administration of d-galactose induces cognitive impairments and oxidative damage in rats. *Behavioural Brain Research*, *302*, 35-43. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.12.041

Burokas, A., Arboleya, S., Moloney, R. D., Peterson, V. L., Murphy, K., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017). Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. *Biological Psychiatry*, *82*(7), 472-487. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.12.031

Butterfield, D. A. (2002). Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: Implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radical Research*, *36*(12), 1307-1313. https://doi.org/10.1080/1071576021000049890

Butterfield, D. A., & Boyd-Kimball, D. (2004). Amyloid β-Peptide (1-42) Contributes to the Oxidative Stress and Neurodegeneration Found in Alzheimer Disease Brain. *Brain Pathology*, *14*(4), 426-432. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2004.tb00087.x

Cacabelos, R., Barquero, M., García, P., Alvarez, X. A., & Varela de Seijas, E. (1991). Cerebrospinal fluid interleukin-1 beta (IL-1 beta) in Alzheimer's disease and neurological disorders. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, *13*(7), 455-458.

Caesar, R., Manieri, M., Kelder, T., Boekschoten, M., Evelo, C., Müller, M., Kooistra, T., Cinti, S., Kleemann, R., & Drevon, C. A. (2010). A Combined Transcriptomics and Lipidomics Analysis of Subcutaneous, Epididymal and Mesenteric Adipose Tissue Reveals Marked Functional Differences. *PLoS ONE*, *5*(7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011525

Calió, M. L., Mosini, A. C., Marinho, D. S., Salles, G. N., Massinhani, F. H., Ko, G. M., & Porcionatto, M. A. (2021). Leptin enhances adult neurogenesis and reduces pathological features in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, *148*, 105219. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105219

Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J.-F., Gibson, G. R., Casteilla, L., … Burcelin, R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, *56*(7), 1761-1772. https://doi.org/10.2337/db06-1491

Cao, Y., Murphy, K. J., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., & Prescott, S. M. (2000). Expression of fatty acid-CoA ligase 4 during development and in brain. *FEBS Letters*, *467*(2-3), 263-267. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01159-5

Caputi, V., Marsilio, I., Filpa, V., Cerantola, S., Orso, G., Bistoletti, M., Paccagnella, N., Martin, S. D., Montopoli, M., Dall'Acqua, S., Crema, F., Gangi, I.-M. D., Galuppini,

F., Lante, I., Bogialli, S., Rugge, M., Debetto, P., Giaroni, C., & Giron, M. C. (2017). Antibiotic-induced dysbiosis of the microbiota impairs gut neuromuscular function in juvenile mice. *British Journal of Pharmacology*, *174*(20), 3623-3639. https://doi.org/10.1111/bph.13965

Caro, J. F., Kolaczynski, J. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Opentanova, I., Goldman, W. H., Lynn, R. B., Zhang, P. L., Sinha, M. K., & Considine, R. V. (1996). Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: A possible mechanism for leptin resistance. *Lancet (London, England)*, *348*(9021), 159-161. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)03173-x

Carpentier, M., Robitaille, Y., DesGroseillers, L., Boileau, G., & Marcinkiewicz, M. (2002). Declining Expression of Neprilysin in Alzheimer Disease Vasculature: Possible Involvement in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *61*(10), 849-856. https://doi.org/10.1093/jnen/61.10.849

Carrano, A., Hoozemans, J. J. M., van der Vies, S. M., van Horssen, J., de Vries, H. E., & Rozemuller, A. J. M. (2012). Neuroinflammation and blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. *Neuro-Degenerative Diseases*, *10*(1-4), 329-331. https://doi.org/10.1159/000334916

Casadesus, G., Shukitt-Hale, B., Stellwagen, H. M., Zhu, X., Lee, H.-G., Smith, M. A., & Joseph, J. A. (2004). Modulation of Hippocampal Plasticity and Cognitive Behavior by Short-term Blueberry Supplementation in Aged Rats. *Nutritional Neuroscience*, *7*(5-6), 309-316. https://doi.org/10.1080/10284150400020482

Cásedas, G., Les, F., Gómez-Serranillos, M. P., Smith, C., & López, V. (2017). Anthocyanin profile, antioxidant activity and enzyme inhibiting properties of blueberry and cranberry juices: A comparative study. *Food & Function*, *8*(11), 4187-4193. https://doi.org/10.1039/C7FO01205E

Cattaneo, A., Cattane, N., Galluzzi, S., Provasi, S., Lopizzo, N., Festari, C., Ferrari, C., Guerra, U. P., Paghera, B., Muscio, C., Bianchetti, A., Volta, G. D., Turla, M., Cotelli, M. S., Gennuso, M., Prelle, A., Zanetti, O., Lussignoli, G., Mirabile, D., … Frisoni, G. B. (2017). Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiology of Aging*, *49*, 60-68. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.019

Cavaliere, G., Trinchese, G., Penna, E., Cimmino, F., Pirozzi, C., Lama, A., Annunziata, C., Catapano, A., Mattace Raso, G., Meli, R., Monda, M., Messina, G., Zammit, C., Crispino, M., & Mollica, M. P. (2019). High-Fat Diet Induces Neuroinflammation and Mitochondrial Impairment in Mice Cerebral Cortex and Synaptic Fraction. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*. https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00509

Centanni, M., Lawley, B., Butts, C. A., Roy, N. C., Lee, J., Kelly, W. J., & Tannock, G. W. (2018). Bifidobacterium pseudolongum in the Ceca of Rats Fed Hi-Maize Starch Has Characteristics of a Keystone Species in Bifidobacterial Blooms. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(15). https://doi.org/10.1128/AEM.00547-18

Cervenka, I., Agudelo, L. Z., & Ruas, J. L. (2017). Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science*, *357*(6349). https://doi.org/10.1126/science.aaf9794

Chandrasekharan, N. V., & Simmons, D. L. (2004). The cyclooxygenases. *Genome Biology*, *5*(9), 241. https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-9-241

Chassaing, B., Srinivasan, G., Delgado, M. A., Young, A. N., Gewirtz, A. T., & Vijay-Kumar, M. (2012). Fecal Lipocalin 2, a Sensitive and Broadly Dynamic Non- Invasive Biomarker for Intestinal Inflammation. *PLOS ONE*, *7*(9), 8.

Chen, C.-H., Zhou, W., Liu, S., Deng, Y., Cai, F., Tone, M., Tone, Y., Tong, Y., & Song, W. (2012). Increased NF-κB signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic

potential in Alzheimer's disease. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, *15*(01), 77-90. https://doi.org/10.1017/S1461145711000149

Chen, S., Jiang, H., Wu, X., & Fang, J. (2016a). Therapeutic Effects of Quercetin on Inflammation, Obesity, and Type 2 Diabetes. *Mediators of Inflammation*, *2016*, e9340637. https://doi.org/10.1155/2016/9340637

Chen, W.-W., Zhang, X., & Huang, W.-J. (2016b). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular Medicine Reports*, *13*(4), 3391-3396. https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4948

Chen, X., Li, Y., Chen, W., Nong, Z., Huang, J., & Chen, C. (2016c). Protective Effect of Hyperbaric Oxygen on Cognitive Impairment Induced by d-Galactose in Mice. *Neurochemical Research*, *41*(11), 3032-3041. https://doi.org/10.1007/s11064-016-2022-x

Chen, Y.-C., Wu, J.-S., Tsai, H.-D., Huang, C.-Y., Chen, J.-J., Sun, G. Y., & Lin, T.-N. (2012). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR-γ) and Neurodegenerative Disorders. *Molecular Neurobiology*, *46*(1), 114-124. https://doi.org/10.1007/s12035-012-8259-8

Chin, S. F., Storkson, J. M., Albright, K. J., Cook, M. E., & Pariza, M. W. (1994). Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. *The Journal of Nutrition*, *124*(12), 2344-2349. https://doi.org/10.1093/jn/124.12.344

Cho, Y. Y., Kang, M. J., Ogawa, S., Yamashita, Y., Fujino, T., & Yamamoto, T. T. (2000). Regulation by adrenocorticotropic hormone and arachidonate of the expression of acyl-CoA synthetase 4, an arachidonate-preferring enzyme expressed in steroidogenic tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *274*(3), 741-745. https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3207

Cho, Y.-Y. (2012). A novel role of brain-type ACS4 isotype in neuronal differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *419*(3), 505-510. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.046

Chogtu, B., Arivazhahan, A., Kunder, S. K., Tilak, A., Sori, R., & Tripathy, A. (2018). Evaluation of Acute and Chronic Effects of D-Galactose on Memory and Learning in Wistar Rats. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, *16*(2), 153-160. https://doi.org/10.9758/cpn.2018.16.2.153

Choi, K. M., Ryu, O. H., Lee, K. W., Kim, H. Y., Seo, J. A., Kim, S. G., Kim, N. H., Choi, D. S., & Baik, S. H. (2007). Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *75*(2), 235-240. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2006.06.019

Choi, S. S., Lee, H. J., Lim, I., Satoh, J., & Kim, S. U. (2014). Human astrocytes: Secretome profiles of cytokines and chemokines. *PloS One*, *9*(4), e92325. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092325

Choi, V. M., Herrou, J., Hecht, A. L., Teoh, W. P., Turner, J. R., Crosson, S., & Bubeck Wardenburg, J. (2016). Activation of Bacteroides fragilis toxin by a novel bacterial protease contributes to anaerobic sepsis in mice. *Nature Medicine*, *22*(5), 563-567. https://doi.org/10.1038/nm.4077

Cholerton, B., Baker, L. D., & Craft, S. (2013). Insulin, cognition, and dementia. European Journal of Pharmacology, 719(1-3), 170-179. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.08.008

Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *71*(2), 621S-629S. https://doi.org/10.1093/ajcn/71.2.621s

Chyan, Y.-J., Poeggeler, B., Omar, R. A., Chain, D. G., Frangione, B., Ghiso, J., & Pappolla, M. A. (1999). Potent Neuroprotective Properties against the Alzheimer β-Amyloid by an Endogenous Melatonin-related Indole Structure, Indole-3-propionic Acid *. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(31), 21937-21942. https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21937

Claesson, M. J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J. R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., Stanton, C., van Sinderen, D., O'Connor, M., Harnedy, N., O'Connor, K., Henry, C., O'Mahony, D., Fitzgerald, A. P., Shanahan, F., … O'Toole, P. W. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108 Suppl 1*, 4586-4591. https://doi.org/10.1073/pnas.1000097107

Clarke, J. R., Lyra E Silva, N. M., Figueiredo, C. P., Frozza, R. L., Ledo, J. H., Beckman, D., Katashima, C. K., Razolli, D., Carvalho, B. M., Frazão, R., Silveira, M. A., Ribeiro, F. C., Bomfim, T. R., Neves, F. S., Klein, W. L., Medeiros, R., LaFerla, F. M., Carvalheira, J. B., Saad, M. J., … De Felice, F. G. (2015). Alzheimer-associated Aβ oligomers impact the central nervous system to induce peripheral metabolic deregulation. *EMBO Molecular Medicine*, *7*(2), 190-210. https://doi.org/10.15252/emmm.201404183

Clarke, S. F., Murphy, E. F., Nilaweera, K., Ross, P. R., Shanahan, F., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2012). The gut microbiota and its relationship to diet and obesity. *Gut Microbes*, *3*(3), 186-202. https://doi.org/10.4161/gmic.20168

Clements, M. P., Bliss, T. V., & Lynch, M. A. (1991). Increase in arachidonic acid concentration in a postsynaptic membrane fraction following the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus. *Neuroscience*, *45*(2), 379-389. https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90235-g

Coelho, A. I., Berry, G. T., & Rubio-Gozalbo, M. E. (2015). Galactose metabolism and health. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *18*(4), 422-427. https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000189

Cogliati, S., Clementi, V., Francisco, M., Crespo, C., Argañaraz, F., & Grau, R. (2020). Bacillus Subtilis Delays Neurodegeneration and Behavioral Impairment in the Alzheimer's Disease Model Caenorhabditis Elegans. *Journal of Alzheimer's Disease*, *73*(3), 1035-1052. https://doi.org/10.3233/JAD-190837

Collins, J., Borojevic, R., Verdu, E. F., Huizinga, J. D., & Ratcliffe, E. M. (2014). Intestinal microbiotas influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterology & Motility*, *26*(1), 98-107. https://doi.org/10.1111/nmo.12236

Condette, C. J., Khorsi-Cauet, H., Morlière, P., Zabijak, L., Reygner, J., Bach, V., & Gay-Quéheillard, J. (2014). Increased Gut Permeability and Bacterial Translocation after Chronic Chlorpyrifos Exposure in Rats. *PLOS ONE*, *9*(7), e102217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102217

Connell, E., Darios, F., Broersen, K., Gatsby, N., Peak-Chew, S.-Y., Rickman, C., & Davletov, B. (2007). Mechanism of arachidonic acid action on syntaxin-Munc18. *EMBO Reports*, *8*(4), 414-419. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400935

Corpuz, H. M., Ichikawa, S., Arimura, M., Mihara, T., Kumagai, T., Mitani, T., Nakamura, S., & Katayama, S. (2018). Long-Term Diet Supplementation with Lactobacillus paracasei K71 Prevents Age-Related Cognitive Decline in Senescence-Accelerated Mouse Prone 8. *Nutrients*, *10*(6), 762. https://doi.org/10.3390/nu10060762

Cortez, M., Carmo, L. S., Rogero, M. M., Borelli, P., & Fock, R. A. (2013). A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF-α production by increasing NF-κB and attenuating PPAR-γ expression in bone marrow mesenchymal stem cells. *Inflammation*, *36*(2), 379-386. https://doi.org/10.1007/s10753-012-9557-z

Corvo, M. L., Marinho, H. S., Marcelino, P., Lopes, R. M., Vale, C. A., Marques, C. R., Martins, L. C. D., Laverman, P., Storm, G., & Martins, M. B. A. F. (2015). Superoxide dismutase enzymosomes: Carrier capacity optimization, in vivo behaviour and therapeutic activity. *Pharmaceutical Research*, *32*(1), 91-102. https://doi.org/10.1007/s11095-014-1447-7

Cressman, D. E., Greenbaum, L. E., DeAngelis, R. A., Ciliberto, G., Furth, E. E., Poli, V., & Taub, R. (1996). Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science (New York, N.Y.)*, *274*(5291), 1379-1383. https://doi.org/10.1126/science.274.5291.1379

Crumeyrolle-Arias, M., Jaglin, M., Bruneau, A., Vancassel, S., Cardona, A., Daugé, V., Naudon, L., & Rabot, S. (2014). Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, *42*, 207-217. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.01.014

Cryan, J. F., O'Riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., Codagnone, M. G., Cussotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. V., Guzzetta, K. E., Jaggar, M., Long-Smith, C. M., Lyte, J. M., Martin, J. A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., … Dinan, T. G. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiological Reviews*, *99*(4), 1877-2013. https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018

Cryan, J. F., O'Riordan, K. J., Sandhu, K., Peterson, V., & Dinan, T. G. (2020). The gut microbiome in neurological disorders. *The Lancet Neurology*, *19*(2), 179-194. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30356-4

Cuajungco, M. P., & Fagét, K. Y. (2003). Zinc takes the center stage: Its paradoxical role in Alzheimer's disease. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *41*(1), 44-56. https://doi.org/10.1016/s0165-0173(02)00219-9

Cui, B., Su, D., Li, W., She, X., Zhang, M., Wang, R., & Zhai, Q. (2018). Effects of chronic noise exposure on the microbiome-gut-brain axis in senescence-accelerated prone mice: Implications for Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 190. https://doi.org/10.1186/s12974-018-1223-4

Cummings, J. L., Dubois, B., Molinuevo, J. L., & Scheltens, P. (2013). International Work Group criteria for the diagnosis of Alzheimer disease. *The Medical Clinics of North America*, *97*(3), 363-368. https://doi.org/10.1016/j.mcna.2013.01.001

Cura, A. J., & Carruthers, A. (2012). AMP kinase regulation of sugar transport in brain capillary endothelial cells during acute metabolic stress. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *303*(8), C806-814. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00437.2011

Curtis, D. R., & Johnston, G. A. (1974). Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergebnisse Der Physiologie, Biologischen Chemie Und Experimentellen Pharmakologie*, *69*(0), 97-188. https://doi.org/10.1007/3-540-06498-2_3

Dagorn, A., Hillion, M., Chapalain, A., Lesouhaitier, O., Duclairoir Poc, C., Vieillard, J., Chevalier, S., Taupin, L., Le Derf, F., & Feuilloley, M. G. J. Y. 2013. (2013). Gamma-aminobutyric acid acts as a specific virulence regulator in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology*, *159*(Pt_2), 339-351. https://doi.org/10.1099/mic.0.061267-0

Dalvi, S., Nguyen, H. H., On, N., Mitchell, R. W., Aukema, H. M., Miller, D. W., & Hatch, G. M. (2015). Exogenous arachidonic acid mediates permeability of human brain microvessel endothelial cells through prostaglandin E2 activation of EP3 and EP4 receptors. *Journal of Neurochemistry*, *135*(5), 867-879. https://doi.org/10.1111/jnc.13117

Dando, S. J., Mackay-Sim, A., Norton, R., Currie, B. J., St John, J. A., Ekberg, J. A. K., Batzloff, M., Ulett, G. C., & Beacham, I. R. (2014). Pathogens penetrating the central

nervous system: Infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. *Clinical Microbiology Reviews*, *27*(4), 691-726. https://doi.org/10.1128/CMR.00118-13

Daneman, R., & Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(1), a020412. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412

Daniel, H., Gholami, A. M., Berry, D., Desmarchelier, C., Hahne, H., Loh, G., Mondot, S., Lepage, P., Rothballer, M., Walker, A., Böhm, C., Wenning, M., Wagner, M., Blaut, M., Schmitt-Kopplin, P., Kuster, B., Haller, D., & Clavel, T. (2014). High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *The ISME Journal*, *8*(2), 295-308. https://doi.org/10.1038/ismej.2013.155

Das, U. N. (2006). Do unsaturated fatty acids function as endogenous antibacterial and antiviral molecules? *The American Journal of Clinical Nutrition*, *83*(2), 390-391. https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.390

Davis, M.-T. B., & Silbert, D. F. (1974). Changes in cell permeability following a marked reduction of saturated fatty acid content of Escherichia coli K-12. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *373*(2), 224-241. https://doi.org/10.1016/0005-2736(74)90147-3

De la Monte, S. M., & Tong, M. (2014). Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, *88*(4), 548-559. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.012

Deane, R., Wu, Z., & Zlokovic, B. V. (2004). RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke*, *35*(11 Suppl 1), 2628-2631. https://doi.org/10.1161/01.STR.0000143452.85382.d1

Deane, R., & Zlokovic, B. V. (2007). Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, *4*(2), 191-197. https://doi.org/10.2174/156720507780362245

Delis, D. C., Massman, P. J., Butters, N., Salmon, D. P., Cermak, L. S., & Kramer, J. H. (1991). Profiles of demented and amnesic patients on the California Verbal Learning Test: Implications for the assessment of memory disorders. *Psychological Assessment: A Journal of Consulting and Clinical Psychology*, *3*(1), 19-26. https://doi.org/10.1037/1040-3590.3.1.19

Delwing-de Lima, D., Hennrich, S. B., Delwing-Dal Magro, D., Aurélio, J. G. M., Serpa, A. P., Augusto, T. W., & Pereira, N. R. (2017). The effect of d-galactose induced oxidative stress on in vitro redox homeostasis in rat plasma and erythrocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *86*, 686-693. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.011

Desbène, C., Malaplate-Armand, C., Youssef, I., Garcia, P., Stenger, C., Sauvée, M., Fischer, N., Rimet, D., Koziel, V., Escanyé, M.-C., Oster, T., Kriem, B., Yen, F. T., Pillot, T., & Olivier, J. L. (2012). Critical role of cPLA2 in Aβ oligomer-induced neurodegeneration and memory deficit. *Neurobiology of Aging*, *33*(6), 1123.e17-1123.e29. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.008

Deshmukh, H. S., Liu, Y., Menkiti, O. R., Mei, J., Dai, N., O'Leary, C. E., Oliver, P. M., Kolls, J. K., Weiser, J. N., & Worthen, G. S. (2014). The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to Escherichia coli K1 sepsis in neonatal mice. *Nature Medicine*, *20*(5), 524-530. https://doi.org/10.1038/nm.3542

de Silva, P. S. A., Luben, R., Shrestha, S. S., Khaw, K. T., & Hart, A. R. (2014). Dietary arachidonic and oleic acid intake in ulcerative colitis etiology: A prospective cohort study using 7-day food diaries. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, *26*(1), 11-18. https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e328365c372

Devore, E. E., Kang, J. H., Breteler, M. M. B., & Grodstein, F. (2012). Dietary intakes of berries and flavonoids in relation to cognitive decline. *Annals of Neurology*, *72*(1), 135-143. https://doi.org/10.1002/ana.23594

de Vries, H. E., Blom-Roosemalen, M. C., van Oosten, M., de Boer, A. G., van Berkel, T. J., Breimer, D. D., & Kuiper, J. (1996). The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *Journal of Neuroimmunology*, *64*(1), 37-43. https://doi.org/10.1016/0165-5728(95)00148-4

D'Mello, C., Le, T., & Swain, M. G. (2009). Cerebral Microglia Recruit Monocytes into the Brain in Response to Tumor Necrosis Factorα Signaling during Peripheral Organ Inflammation. *Journal of Neuroscience*, *29*(7), 2089-2102. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3567-08.2009

D'Mello, C., Riazi, K., Le, T., Stevens, K. M., Wang, A., McKay, D. M., Pittman, Q. J., & Swain, M. G. (2013). P-Selectin-Mediated Monocyte–Cerebral Endothelium Adhesive Interactions Link Peripheral Organ Inflammation to Sickness Behaviors. *Journal of Neuroscience*, *33*(37), 14878-14888. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1329-13.2013

D'Mello, C., Ronaghan, N., Zaheer, R., Dicay, M., Le, T., MacNaughton, W. K., Surrette, M. G., & Swain, M. G. (2015). Probiotics Improve Inflammation-Associated Sickness Behavior by Altering Communication between the Peripheral Immune System and the Brain. *Journal of Neuroscience*, *35*(30), 10821-10830. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0575-15.2015

Dong, X., Wang, Y., & Qin, Z. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, *30*(4), 379-387. https://doi.org/10.1038/aps.2009.24

Douillard, F. P., & de Vos, W. M. (2014). Functional genomics of lactic acid bacteria: From food to health. *Microbial Cell Factories*, *13 Suppl 1*, S8. https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S8

Droogsma, E., van Asselt, D., Bieze, H., Veeger, N., & De Deyn, P. P. (2015). The relationship of weight change trajectory with medial temporal lobe atrophy in patients with mild Alzheimer's disease: Results from a cohort study. *Alzheimer's Research & Therapy*, *7*(1), 18. https://doi.org/10.1186/s13195-015-0098-1

Dubois, B., & Albert, M. L. (2004). Amnestic MCI or prodromal Alzheimer's disease? *The Lancet Neurology*, *3*(4), 246-248. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00710-0

Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Dekosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P. J., & Scheltens, P. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: Revising the NINCDS-ADRDA criteria. *The Lancet. Neurology*, *6*(8), 734-746. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70178-3

Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J. L., Blennow, K., DeKosky, S. T., Gauthier, S., Selkoe, D., Bateman, R., Cappa, S., Crutch, S., Engelborghs, S., Frisoni, G. B., Fox, N. C., Galasko, D., Habert, M.-O., Jicha, G. A., Nordberg, A., … Cummings, J. L. (2014). Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: The IWG-2 criteria. *The Lancet Neurology*, *13*(6), 614-629. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70090-0

Dunn, B., Stein, P., & Cavazzoni, P. (2021). Approval of Aducanumab for Alzheimer Disease-the FDA's Perspective. *JAMA Internal Medicine*. https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2021.4607

EFSA. (2010). Scientific Opinion on establishing Food-Based Dietary Guidelines. *EFSA Journal*, *8*(3), 1460. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1460

Ejtahed, H.-S., Hoseini-Tavassol, Z., Khatami, S., Zangeneh, M., Behrouzi, A., Ahmadi Badi, S., Moshiri, A., Hasani-Ranjbar, S., Soroush, A.-R., Vaziri, F., Fateh, A., Ghanei, M., Bouzari, S., Najar-Peerayeh, S., Siadat, S. D., & Larijani, B. (2020). Main gut bacterial composition differs between patients with type 1 and type 2 diabetes and non-diabetic adults. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, *19*(1), 265-271. https://doi.org/10.1007/s40200-020-00502-7

Elias, M. F., Goodell, A. L., & Waldstein, S. R. (2012). Obesity, cognitive functioning and dementia: Back to the future. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *30 Suppl 2*, S113-125. https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111175

Elli, M., Callegari, M. L., Ferrari, S., Bessi, E., Cattivelli, D., Soldi, S., Morelli, L., Goupil Feuillerat, N., & Antoine, J.-M. (2006). Survival of Yogurt Bacteria in the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(7), 5113-5117. https://doi.org/10.1128/AEM.02950-05

Engeli, S., Feldpausch, M., Gorzelniak, K., Hartwig, F., Heintze, U., Janke, J., Mohlig, M., Pfeiffer, A. F. H., Luft, F. C., & Sharma, A. M. (2003). Association Between Adiponectin and Mediators of Inflammation in Obese Women. *Diabetes*, *52*(4), 942-947. https://doi.org/10.2337/diabetes.52.4.942

Erny, D., Hrabě de Angelis, A. L., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., Keren-Shaul, H., Mahlakoiv, T., Jakobshagen, K., Buch, T., Schwierzeck, V., Utermöhlen, O., Chun, E., Garrett, W. S., McCoy, K. D., Diefenbach, A., Staeheli, P., Stecher, B., Amit, I., & Prinz, M. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature Neuroscience*, *18*(7), 965-977. https://doi.org/10.1038/nn.4030

Erta, M., Quintana, A., & Hidalgo, J. (2012). Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. *International Journal of Biological Sciences*, *8*(9), 1254-1266. https://doi.org/10.7150/ijbs.4679

Eto, M., Shindou, H., Koeberle, A., Harayama, T., Yanagida, K., & Shimizu, T. (2012). Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 is the key enzyme for incorporating arachidonic acid into glycerophospholipids during adipocyte differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(12), 16267-16280. https://doi.org/10.3390/ijms131216267

Farlow, M. R., He, Y., Tekin, S., Xu, J., Lane, R., & Charles, H. C. (2004). Impact of APOE in mild cognitive impairment. *Neurology*, *63*(10), 1898-1901. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000144279.21502.b7

Farooqui, A. A., Horrocks, L. A., & Farooqui, T. (2000). Deacylation and reacylation of neural membrane glycerophospholipids. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, *14*(3), 123-135. https://doi.org/10.1385/jmn:14:3:123

Farr, O. M., Tsoukas, M. A., & Mantzoros, C. S. (2015). Leptin and the brain: Influences on brain development, cognitive functioning and psychiatric disorders. *Metabolism*, *64*(1), 114-130. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.07.004

Fasshauer, M., Kralisch, S., Klier, M., Lossner, U., Bluher, M., Klein, J., & Paschke, R. (2003). Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *301*(4), 1045-1050. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00090-1

Fatemi, I., Khaluoi, A., Kaeidi, A., Shamsizadeh, A., Heydari, S., & Allahtavakoli, M. A. (2018). Protective effect of metformin on D-galactose-induced aging model in mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *21*(1), 19-25. https://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.24331.6071

Feeney, S. N. (2007). Serotonin Syndrome. In L. C. Garfunkel, J. M. Kaczorowski, & C. Christy (Éds.), *Pediatric Clinical Advisor (Second Edition)* (p. 516-517). Mosby. https://doi.org/10.1016/B978-032303506-4.10295-0

Ferstl, R., Frei, R., Schiavi, E., Konieczna, P., Barcik, W., Ziegler, M., Lauener, R. P., Chassard, C., Lacroix, C., Akdis, C. A., & O'Mahony, L. (2014). Histamine receptor 2 is a key influence in immune responses to intestinal histamine-secreting microbes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *134*(3), 744-746.e3. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.04.034

Fiala, M., Zhang, L., Gan, X., Sherry, B., Taub, D., Graves, M. C., Hama, S., Way, D., Weinand, M., Witte, M., Lorton, D., Kuo, Y. M., & Roher, A. E. (1998). Amyloid-beta induces chemokine secretion and monocyte migration across a human blood—Brain barrier model. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *4*(7), 480-489.

Figueira, J., Jonsson, P., Nordin Adolfsson, A., Adolfsson, R., Nyberg, L., & Öhman, A. (2016). NMR analysis of the human saliva metabolome distinguishes dementia patients from matched controls. *Molecular BioSystems*, *12*(8), 2562-2571. https://doi.org/10.1039/c6mb00233a

Fillit, H., Ding, W. H., Buee, L., Kalman, J., Altstiel, L., Lawlor, B., & Wolf-Klein, G. (1991). Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, *129*(2), 318-320. https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90490-k

Fischer, K., Melo van Lent, D., Wolfsgruber, S., Weinhold, L., Kleineidam, L., Bickel, H., Scherer, M., Eisele, M., Van den Bussche, H., Wiese, B., König, H.-H., Weyerer, S., Pentzek, M., Röhr, S., Maier, W., Jessen, F., Schmid, M., Riedel-Heller, S. G., & Wagner, M. (2018). Prospective Associations between Single Foods, Alzheimer's Dementia and Memory Decline in the Elderly. *Nutrients*, *10*(7), 852. https://doi.org/10.3390/nu10070852

Flanders, K. C., Ludecke, G., Engels, S., Cissel, D. S., Roberts, A. B., Kondaiah, P., Lafyatis, R., Sporn, M. B., & Unsicker, K. (1991). *Localization and actions of transforming growth factories in the embryonic nervous system*. 13.

Foley, J. F. (2007). TNF and Alzheimer's Disease. *Science Signaling*, *2007*(402), tw320-tw320. https://doi.org/10.1126/stke.4022007tw320

Fontaine, L., & Hols, P. (2008). The inhibitory spectrum of thermophilin 9 from Streptococcus thermophilus LMD-9 depends on the production of multiple peptides and the activity of BlpG (St), a thiol-disulfide oxidase. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(4), 1102-1110. https://doi.org/10.1128/AEM.02030-07

Forbes, E., Hulett, M., Ahrens, R., Wagner, N., Smart, V., Matthaei, K. I., Brandt, E. B., Dent, L. A., Rothenberg, M. E., Tang, M., Foster, P. S., & Hogan, S. P. (2006). ICAM-1-dependent pathways regulate colonic eosinophilic inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, *80*(2), 330-341. https://doi.org/10.1189/jlb.1105643

Freeman, D. J., Norrie, J., Caslake, M. J., Gaw, A., Ford, I., Lowe, G. D. O., O'Reilly, D. S. J., Packard, C. J., Sattar, N., & West of Scotland Coronary Prevention Study. (2002). C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes*, *51*(5), 1596-1600. https://doi.org/10.2337/diabetes.51.5.1596

Freeman, E. J., Terrian, D. M., & Dorman, R. V. (1990). Presynaptic facilitation of glutamate release from isolated hippocampal mossy fiber nerve endings by arachidonic acid. *Neurochemical Research*, *15*(7), 743-750. https://doi.org/10.1007/BF00973656

Freese, E., Sheu, C. W., & Galliers, E. (1973). Function of Lipophilic Acids as Antimicrobial Food Additives. *Nature*, *241*(5388), 321-325. https://doi.org/10.1038/241321a0

Friedland, R. P. (2015). Mechanisms of Molecular Mimicry Involving the Microbiota in Neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*, *45*(2), 349-362. https://doi.org/10.3233/JAD-142841

Fujii, Y., Nguyen, T. T. T., Fujimura, Y., Kameya, N., Nakamura, S., Arakawa, K., & Morita, H. (2019). Fecal metabolite of a gnotobiotic mouse transplanted with gut microbiota from a patient with Alzheimer's disease. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *83*(11), 2144-2152. https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1644149

Funk, C. D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5548), 1871-1875. https://doi.org/10.1126/science.294.5548.1871

Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., & Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: A lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of Cell Biology*, *156*(6), 1099-1111. https://doi.org/10.1083/jcb.200110122

Galloway, S., Jian, L., Johnsen, R., Chew, S., & Mamo, J. C. L. (2007). B-Amyloid or its precursor protein is found in epithelial cells of the small intestine and is stimulated by high-fat feeding. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *18*(4), 279-284. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.07.003

Galloway, S., Takechi, R., Pallebage-Gamarallage, M. M., Dhaliwal, S. S., & Mamo, J. C. (2009). Amyloid-β colocalizes with apolipoprotein B in absorptive cells of the small intestine. *Lipids in Health and Disease*, *8*(1), 46. https://doi.org/10.1186/1476-511X-8-46

Gao, X., Chang, S., Liu, S., Peng, L., Xie, J., Dong, W., Tian, Y., & Sheng, J. (2020). Correlations between α-Linolenic Acid-Improved Multitissue Homeostasis and Gut Microbiota in Mice Fed a High-Fat Diet. *MSystems*, *5*(6). https://doi.org/10.1128/mSystems.00391-20

Garcez, M. L., de Carvalho, C. A., Mina, F., Bellettini-Santos, T., Schiavo, G. L., da Silva, S., Campos, A. C. B. F., Varela, R. B., Valvassori, S. S., Damiani, A. P., Longaretti, L. M., de Andrade, V. M., & Budni, J. (2018). Sodium butyrate improves memory and modulates the activity of histone deacetylases in aged rats after the administration of d-galactose. *Experimental Gerontology*, *113*, 209-217. https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.10.005

Garcia-Hernandez, V., Quiros, M., & Nusrat, A. (2017). Intestinal epithelial claudins: Expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1397*(1), 66-79. https://doi.org/10.1111/nyas.13360

Gareau, M. G., Wine, E., Rodrigues, D. M., Cho, J. H., Whary, M. T., Philpott, D. J., MacQueen, G., & Sherman, P. M. (2011). Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut*, *60*(3), 307-317. https://doi.org/10.1136/gut.2009.202515

Gasparini, L., Gouras, G. K., Wang, R., Gross, R. S., Beal, M. F., Greengard, P., & Xu, H. (2001). Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *21*(8), 2561-2570.

Gasser, E., Moutos, C. P., Downes, M., & Evans, R. M. (2017). FGF1—A new weapon to control type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, *13*(10), 599-609. https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.78

Gatz, M., Reynolds, C. A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J. A., Berg, S., Fiske, A., & Pedersen, N. L. (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer

disease. *Archives of General Psychiatry*, *63*(2), 168-174. https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.2.168

GBD 2013 Risk Factors Collaborators. (2015). Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990–2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet (London, England)*, *386*(10010), 2287-2323. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00128-2

Ghanbari, S., Yonessi, M., Mohammadirad, A., Gholami, M., Baeeri, M., Khorram-Khorshid, H. R., Gharibdoost, F., & Abdollahi, M. (2012). Effects of IMOD™ and Angipars™ on mouse D-galactose-induced model of aging. *Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, *20*(1), 68. https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-68

Girardet, C., Bonnet, M. S., Jdir, R., Sadoud, M., Thirion, S., Tardivel, C., Roux, J., Lebrun, B., Mounien, L., Trouslard, J., Jean, A., Dallaporta, M., & Troadec, J.-D. (2011). Central inflammation and sickness-like behavior induced by the food contaminant deoxynivalenol: A PGE2-independent mechanism. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *124*(1), 179-191. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr219

Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., & James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, *349*(6311), 704-706. https://doi.org/10.1038/349704a0

Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., & Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digestor as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(7), 2802-2813.

Goehler, L. E., Gaykema, R. P. A., Opitz, N., Reddaway, R., Badr, N., & Lyte, M. (2005). Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: Early responses to intestinal infection with Campylobacter jejuni. *Brain, Behavior, and Immunity*, *19*(4), 334-344. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.09.002

Götz, J., Bodea, L.-G., & Goedert, M. (2018). Rodent models for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(10), 583-598. https://doi.org/10.1038/s41583-018-0054-8

Govindarajan, N., Agis-Balboa, R. C., Walter, J., Sananbenesi, F., & Fischer, A. (2011). Sodium butyrate improves memory function in an Alzheimer's disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *26*(1), 187-197. https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110080

Gratuze, M., Julien, J., Petry, F. R., Morin, F., & Planel, E. (2017). Insulin deprivation induces PP2A inhibition and tau hyperphosphorylation in hTau mice, a model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Scientific Reports*, *7*, 46359. https://doi.org/10.1038/srep46359

Greco, S. J., Sarkar, S., Johnston, J. M., Zhu, X., Su, B., Casadesus, G., Ashford, J. W., Smith, M. A., & Tezapsidis, N. (2008). Leptin reduces Alzheimer's disease-related tau phosphorylation in neuronal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *376*(3), 536-541. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.026

Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology*, *29*(1), 415-445. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101322

Griffin, W. S., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L. J., White, C. L., & Araoz, C. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(19), 7611-7615.

Gu, Y., Luchsinger, J. A., Stern, Y., & Scarmeas, N. (2010). Mediterranean Diet, Inflammatory and Metabolic Biomarkers, and Risk of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *22*(2), 483-492. https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100897

Guénette, S. Y. (2003). Astrocytes: A cellular player in Aβ clearance and degradation. *Trends in Molecular Medicine*, *9*(7), 279-280. https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00112-6

Guerville, M., Leroy, A., Sinquin, A., Laugerette, F., Michalski, M.-C., & Boudry, G. (2017). Western-diet consumption induces alteration of barrier function mechanisms in the ileum that correlates with metabolic endotoxemia in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *313*(2), E107-E120. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00372.2016

Guillemot-Legris, O., Masquelier, J., Everard, A., Cani, P. D., Alhouayek, M., & Muccioli, G. G. (2016). High-fat diet feeding differentially affects the development of inflammation in the central nervous system. *Journal of Neuroinflammation*, *13*(1). https://doi.org/10.1186/s12974-016-0666-8

Gulhane, M., Murray, L., Lourie, R., Tong, H., Sheng, Y. H., Wang, R., Kang, A., Schreiber, V., Wong, K. Y., Magor, G., Denman, S., Begun, J., Florin, T. H., Perkins, A., Cuív, P. Ó., McGuckin, M. A., & Hasnain, S. Z. (2016). High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22. *Scientific Reports*, *6*. https://doi.org/10.1038/srep28990

Guo, C.-A., Kogan, S., Amano, S. U., Wang, M., Dagdeviren, S., Friedline, R. H., Aouadi, M., Kim, J. K., & Czech, M. P. (2013). CD40 deficiency in mice exacerbates obesity-induced adipose tissue inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *304*(9), E951-E963. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00514.2012

Guo, J.-T., Yu, J., Grass, D., de Beer, F. C., & Kindy, M. S. (2002). Inflammation-dependent cerebral deposition of serum amyloid a protein in a mouse model of amyloidosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(14), 5900-5909. https://doi.org/20026577

Gupta, S., Knight, A. G., Gupta, S., Keller, J. N., & Bruce-Keller, A. J. (2012). Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, *120*(6), 1060-1071. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07660.x

Ha, Y. L., Grimm, N. K., & Pariza, M. W. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: Heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, *8*(12), 1881-1887. https://doi.org/10.1093/carcin/8.12.1881

Haeggström, J. Z., & Funk, C. D. (2011). Lipoxygenase and leukotriene pathways: Biochemistry, biology, and roles in disease. *Chemical Reviews*, *111*(10), 5866-5898. https://doi.org/10.1021/cr200246d

Hakkak, R., & Bell, A. (2017). Obesity and the Link to Chronic Disease Development. *Journal of Obesity and Chronic Diseases*, *01*(01). https://doi.org/10.17756/jocd.2016-001

Hambrecht, G. S., Adesuyi, S. A., Holt, S., & Ellis, E. F. (1987). Brain 12-HETE formation in different species, brain regions, and in brain microvessels. *Neurochemical Research*, *12*(11), 1029-1033. https://doi.org/10.1007/BF00970932

Hameed, S., Fuh, J.-L., Senanarong, V., Ebenezer, E. G. M., Looi, I., Dominguez, J. C., Park, K. W., Karanam, A. K., & Simon, O. (2020). Role of Fluid Biomarkers and PET Imaging in Early Diagnosis and its Clinical Implication in the Management of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, *4*(1), 21-37. https://doi.org/10.3233/ADR-190143

Han, X., Tang, S., Dong, L., Song, L., Dong, Y., Wang, Y., & Du, Y. (2017). Loss of nitrergic and cholinergic neurons in the enteric nervous system of APP/PS1 transgenic mouse model. *Neuroscience Letters*, *642*, 59-65. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.061

Hanger, D. P., Anderton, B. H., & Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: The therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends in Molecular Medicine*, *15*(3), 112-119. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.01.003

Harach, T., Marungruang, N., Duthilleul, N., Cheatham, V., Mc Coy, K. D., Frisoni, G., Neher, J. J., Fåk, F., Jucker, M., Lasser, T., & Bolmont, T. (2017). Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Scientific Reports*, *7*(1), 41802. https://doi.org/10.1038/srep41802

Haran, J. P., Bhattarai, S. K., Foley, S. E., Dutta, P., Ward, D. V., Bucci, V., & McCormick, B. A. (2019). Alzheimer's Disease Microbiome Is Associated with Dysregulation of the Anti-Inflammatory P-Glycoprotein Pathway. *MBio*, *10*(3). https://doi.org/10.1128/mBio.00632-19

Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., Pahwa, J. S., Moskvina, V., Dowzell, K., Williams, A., Jones, N., Thomas, C., Stretton, A., Morgan, A. R., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M. K., Brayne, C., … Williams, J. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, *41*(10), 1088-1093. https://doi.org/10.1038/ng.440

Hartmann, P., Seebauer, C. T., Mazagova, M., Horvath, A., Wang, L., Llorente, C., Varki, N. M., Brandl, K., Ho, S. B., & Schnabl, B. (2016). Deficiency of intestinal mucin-2 protects mice from diet-induced fatty liver disease and obesity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *310*(5), G310-G322. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00094.2015

Hazan, S. (2020). Rapid improvement in Alzheimer's disease symptoms following fecal microbiota transplantation: A case report. *The Journal of International Medical Research*, *48*(6), 300060520925930. https://doi.org/10.1177/0300060520925930

He, M.-Q., Wang, J.-Y., Wang, Y., Sui, J., Zhang, M., Ding, X., Zhao, Y., Chen, Z.-Y., Ren, X.-X., & Shi, B.-Y. (2020). High-fat diet-induced adipose tissue expansion occurs prior to insulin resistance in C57BL/6J mice. *Chronic Diseases and Translational Medicine*, *6*(3), 198-207. https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2020.06.003

Henao-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W. Z., Strowig, T., Thaiss, C. A., Kau, A. L., Eisenbarth, S. C., Jurczak, M. J., Camporez, J.-P., Shulman, G. I., Gordon, J. I., Hoffman, H. M., & Flavell, R. A. (2012). Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*, *482*(7384), 179-185. https://doi.org/10.1038/nature10809

Henderson, J. M., Kutner, M. H., & Bain, R. P. (1982). First-Order Clearance of Plasma Galactose: The Effect of Liver Disease. *Gastroenterology*, *83*(5), 1090-1096. https://doi.org/10.1016/S0016-5085(82)80078-4

Heupel, K., Sargsyan, V., Plomp, J. J., Rickmann, M., Varoqueaux, F., Zhang, W., & Krieglstein, K. (2008). Loss of transforming growth factor-beta 2 leads to impairment of central synapse function. *Neural Development*, *3*, 25. https://doi.org/10.1186/1749-8104-3-25

Hewett, S. J., Bell, S. C., & Hewett, J. A. (2006). Contributions of cyclooxygenase-2 to neuroplasticity and neuropathology of the central nervous system. *Pharmacology & Therapeutics*, *112*(2), 335-357. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.011

Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., & Kishimoto, T. (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, *63*(6), 1149-1157. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90411-7

Hishikawa, D., Shindou, H., Kobayashi, S., Nakanishi, H., Taguchi, R., & Shimizu, T. (2008). Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(8), 2830-2835. https://doi.org/10.1073/pnas.0712245105

Ho, S.-T., Hsieh, Y.-T., Wang, S.-Y., & Chen, M.-J. (2019). Improving effect of a probiotic mixture on memory and learning abilities in d-galactose–treated aging mice. *Journal of Dairy Science*, *102*(3), 1901-1909. https://doi.org/10.3168/jds.2018-15811

Hodges, J. R., & Patterson, K. (1995). Is semantic memory consistently impaired early during Alzheimer's disease? Neuroanatomical and diagnostic implications. *Neuropsychologia*, *33*(4), 441-459. https://doi.org/10.1016/0028-3932(94)00127-B

Hodges, J. R., Patterson, K., Oxbury, S., & Funnell, E. (1992). Semantic dementia. Progressive fluent aphasia with temporal lobe atrophy. *Brain: A Journal of Neurology*, *115 (Pt 6)*, 1783-1806. https://doi.org/10.1093/brain/115.6.1783

Hoeberichts, F. A., & Woltering, E. J. (2003). Multiple mediators of plant programmed cell death: Interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *25*(1), 47-57. https://doi.org/10.1002/bies.10175

Hoozemans, J. J. M., Rozemuller, J. M., van Haastert, E. S., Veerhuis, R., & Eikelenboom, P. (2008). Cyclooxygenase-1 and -2 in the different stages of Alzheimer's disease pathology. *Current Pharmaceutical Design*, *14*(14), 1419-1427. https://doi.org/10.2174/138161208784480171

Hsieh, H.-M., Wu, W.-M., & Hu, M.-L. (2009). Soy isoflavones attenuate oxidative stress and improve parameters related to aging and Alzheimer's disease in C57BL/6J mice treated with D-galactose. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *47*(3), 625-632. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.12.026

Huang, E., Leone, V., Devkota, S., Wang, Y., Brady, M., & Chang, E. (2013). Composition of Dietary Fat Source Shapes Gut Microbiota Architecture and Alters Host Inflammatory Mediators in Mouse Adipose Tissue. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, *37*(6), 10.1177/0148607113486931. https://doi.org/10.1177/0148607113486931

Huang, X., Moir, R. D., Tanzi, R. E., Bush, A. I., & Rogers, J. T. (2004). Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1012*, 153-163. https://doi.org/10.1196/annals.1306.012

Huang, Y., Schoonmaker, J. P., Bradford, B. J., & Beitz, D. C. (2008). Response of milk fatty acid composition to dietary supplementation of soy oil, conjugated linoleic acid, or both. *Journal of Dairy Science*, *91*(1), 260-270. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0344

Hubbard, T. D., Murray, I. A., Bisson, W. H., Lahoti, T. S., Gowda, K., Amin, S. G., Patterson, A. D., & Perdew, G. H. (2015). Adaptation of the human aryl hydrocarbon receptor to sense microbiota-derived indoles. *Scientific Reports*, *5*(1), 12689. https://doi.org/10.1038/srep12689

Hyland, N. P., & Cryan, J. F. (2016). Microbe-host interactions: Influence of the gut microbiota on the enteric nervous system. *Developmental Biology*, *417*(2), 182-187. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.06.027

Hyman, B., Van Hoesen, G., Damasio, A., & Barnes, C. (1984). *Alzheimer's disease: Cell-specific pathology isolates the hippocampal formation | Science*.

INSERM. (2020). *Maladie d'Alzheimer*. Inserm - La science pour la santé. https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/alzheimer-maladie

Ip, C., Chin, S. F., Scimeca, J. A., & Pariza, M. W. (1991). Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Research*, *51*(22), 6118-6124.

Jack, C. R., Albert, M., Knopman, D. S., McKhann, G. M., Sperling, R. A., Carillo, M., Thies, W., & Phelps, C. H. (2011). Introduction to Revised Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease: National Institute on Aging and the Alzheimer Association Workgroups. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, *7*(3), 257-262. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.004

Jahn, H. (2013). Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *15*(4), 445-454.

Jakobsson, H. E., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Schütte, A., Ermund, A., Boysen, P., Bemark, M., Sommer, F., Bäckhed, F., Hansson, G. C., & Johansson, M. E. V. (2015). The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Reports*, *16*(2), 164-177. https://doi.org/10.15252/embr.201439263

Jakobsson, P. J., Thorén, S., Morgenstern, R., & Samuelsson, B. (1999). Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(13), 7220-7225. https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7220

James, B. D., Wilson, R. S., Boyle, P. A., Trojanowski, J. Q., Bennett, D. A., & Schneider, J. A. (2016). TDP-43 stage, mixed pathologies, and clinical Alzheimer's-type dementia. *Brain: A Journal of Neurology*, *139*(11), 2983-2993. https://doi.org/10.1093/brain/aww224

Jiang, Q., Lu, C., Sun, T., Zhou, J., Li, Y., Ming, T., Bai, L., Wang, Z. J., & Su, X. (2019). Alterations of the Brain Proteome and Gut Microbiota in D-Galactose-Induced Brain-Aging Mice with Krill Oil Supplementation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(35), 9820-9830. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03827

Jin, U.-H., Cheng, Y., Park, H., Davidson, L. A., Callaway, E. S., Chapkin, R. S., Jayaraman, A., Asante, A., Allred, C., Weaver, E. A., & Safe, S. (2017). Short Chain Fatty Acids Enhance Aryl Hydrocarbon (Ah) Responsiveness in Mouse Colonocytes and Caco-2 Human Colon Cancer Cells. *Scientific Reports*, *7*(1), 10163. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10824-x

Jolivalt, C. G., Lee, C. A., Beiswenger, K. K., Smith, J. L., Orlov, M., Torrance, M. A., & Masliah, E. (2008). Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: Parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin. *Journal of Neuroscience Research*, *86*(15), 3265-3274. https://doi.org/10.1002/jnr.21787

Junjua, M., Kechaou, N., Chain, F., Awussi, A. A., Roussel, Y., Perrin, C., Roux, E., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L. G., Le Roux, Y., Chatel, J.-M., & Dary-Mourot, A. (2016). A large-scale in vitro screening of Streptococcus thermophilus strains revealed strains with a high anti-inflammatory potential. *LWT - Food Science and Technology*, *70*, 78-87. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.006

Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J., & Truant, J. P. (1972). Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *2*(1), 23-28. https://doi.org/10.1128/AAC.2.1.23

Kaether, C., Haass, C., & Steiner, H. (2006). Assembly, Trafficking and Function of γ-Secretase. *Neurodegenerative Diseases*, *3*(4-5), 275-283. https://doi.org/10.1159/000095267

Kahn, M. S., Kranjac, D., Alonzo, C. A., Haase, J. H., Cedillos, R. O., McLinden, K. A., Boehm, G. W., & Chumley, M. J. (2012). Prolonged elevation in hippocampal Aβ and cognitive deficits following repeated endotoxin exposure in the mouse. *Behavioural Brain Research*, *229*(1), 176-184. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.01.010

Kalmijn, S., Launer, L. J., Ott, A., Witteman, J. C. M., Hofman, A., & Breteler, M. M. B. (1997). Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam study. *Annals of Neurology*, *42*(5), 776-782. https://doi.org/10.1002/ana.410420514

Kan, C. F. K., Singh, A. B., Stafforini, D. M., Azhar, S., & Liu, J. (2014). Arachidonic acid downregulates acyl-CoA synthetase 4 expressions by promoting its ubiquitination and proteasomal degradation. *Journal of Lipid Research*, *55*(8), 1657-1667. https://doi.org/10.1194/jlr.M045971

Kandimalla, R., Thirumala, V., & Reddy, P. H. (2017). Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A Critical Appraisal. *Biochimica et biophysica acta*, *1863*(5), 1078-1089. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.08.018

Kang, J. H., Ascherio, A., & Grodstein, F. (2005). Fruit and vegetable consumption and cognitive decline in aging women. *Annals of Neurology*, *57*(5), 713-720. https://doi.org/10.1002/ana.20476

Kapasi, A., DeCarli, C., & Schneider, J. A. (2017). Impact of Multiple Pathologies on the Threshold for Clinically Overt Dementia. *Acta neuropathologica*, *134*(2), 171-186. https://doi.org/10.1007/s00401-017-1717-7

Karmi, A., Iozzo, P., Viljanen, A., Hirvonen, J., Fielding, B. A., Virtanen, K., Oikonen, V., Kemppainen, J., Viljanen, T., Guiducci, L., Haaparanta-Solin, M., Någren, K., Solin, O., & Nuutila, P. (2010). Increased brain fatty acid uptake in metabolic syndrome. *Diabetes*, *59*(9), 2171-2177. https://doi.org/10.2337/db09-0138

Katsuki, H., & Okuda, S. (1995). Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance. *Progress in Neurobiology*, *46*(6), 607-636. https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)00016-o

Kaur, H., & Halliwell, B. (1994). Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Letters*, *350*(1), 9-12. https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00722-5

Kaur, H., Nagamoto-Combs, K., Golovko, S., Golovko, M. Y., Klug, M. G., & Combs, C. K. (2020). Probiotics ameliorate intestinal pathophysiology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *92*, 114-134. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.04.009

Kekkonen, R.-A., Kajasto, E., Miettinen, M., Veckman, V., Korpela, R., & Julkunen, I. (2008). Probiotic Leuconostoc mesenteroides ssp. Cremoris and Streptococcus thermophilus induce IL-12 and IFN-gamma production. *World Journal of Gastroenterology*, *14*(8), 1192-1203. https://doi.org/10.3748/wjg.14.1192

Kelly, E., Vyas, P., & Weber, J. T. (2018). Biochemical Properties and Neuroprotective Effects of Compounds in Various Species of Berries. *Molecules*, *23*(1), 26. https://doi.org/10.3390/molecules23010026

Kesika, P., Suganthy, N., Sivamaruthi, B. S., & Chaiyasut, C. (2021). Role of gut-brain axis, gut microbial composition, and probiotic intervention in Alzheimer's disease. *Life Sciences*, *264*, 118627. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118627

Khosravi, A., Yáñez, A., Price, J. G., Chow, A., Merad, M., Goodridge, H. S., & Mazmanian, S. K. (2014). Gut Microbiota Promote Hematopoiesis to Control Bacterial Infection. *Cell Host & Microbe*, *15*(3), 374-381. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.006

Kim, H. Y., Lee, D. K., Chung, B.-R., Kim, H. V., & Kim, Y. (2016). Intracerebroventricular Injection of Amyloid-β Peptides in Normal Mice to Acutely Induce Alzheimer-like Cognitive Deficits. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *109*. https://doi.org/10.3791/53308

Kim, Y., Wu, A. G., Jaja-Chimedza, A., Graf, B. L., Waterman, C., Verzi, M. P., & Raskin, I. (2017). Isothiocyanate-enriched moringa seed extract alleviates ulcerative colitis symptoms in mice. *PLoS ONE*, *12*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184709

Kimura, A., Naka, T., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., & Kishimoto, T. (2008). Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(28), 9721-9726. https://doi.org/10.1073/pnas.0804231105

Kittana, H., Gomes-Neto, J. C., Heck, K., Geis, A. L., Segura Muñoz, R. R., Cody, L. A., Schmaltz, R. J., Bindels, L. B., Sinha, R., Hostetter, J. M., Benson, A. K., & Ramer-Tait, A. E. (2018). Commensal Escherichia coli Strains Can Promote Intestinal Inflammation via Differential Interleukin-6 Production. Frontiers in Immunology, 9, 2318. Mao, B., Gu, J., Li, D., Cui, S., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2018). Effects of Different Doses of Fructooligosaccharides (FOS) on the Composition of Mice Fecal Microbiota, Especially the Bifidobacterium Composition. Nutrients, 10(8), E1105. https://doi.org/10.3390/nu10081105. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02318

Koch, C. E., Lowe, C., Pretz, D., Williams, L. M., & Tups, A. (2013). High fat diet induces leptin resistance in the absence of endogenous leptin. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, *121*(10), P9. https://doi.org/10.1055/s-0033-1359444

Koch, M., & Jensen, M. K. (2016). Association of the MIND diet with cognition and risk of Alzheimer's disease. *Current Opinion in Lipidology*, *27*(3), 303-304. https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000304

Koenigsknecht, J., & Landreth, G. (2004). Microglial Phagocytosis of Fibrillar β-Amyloid through a β1 Integrin-Dependent Mechanism. *The Journal of Neuroscience*, *24*(44), 9838-9846. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2557-04.2004

Koivisto, A. M., Helisalmi, S., Pihlajamäki, J., Moilanen, L., Kuusisto, J., Laakso, M., Hiltunen, M., Keijo, K., Hänninen, T., Helkala, E.-L., Kervinen, K., Kesäniemi, Y. A., & Soininen, H. (2005). Interleukin-6 promoter polymorphism and late-onset Alzheimer's disease in the Finnish population. *Journal of Neurogenetics*, *19*(3-4), 155-161. https://doi.org/10.1080/01677060600569721

Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J., & Ripova, D. (2012). Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, *2012*, 731526. https://doi.org/10.1155/2012/731526

Kong, C., Gao, R., Yan, X., Huang, L., & Qin, H. (2019). Probiotics improve gut microbiota dysbiosis in obese mice fed a high-fat or high-sucrose diet. *Nutrition*, *60*, 175-184. https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.10.002

König, J., Wells, J., Cani, P. D., García-Ródenas, C. L., MacDonald, T., Mercenier, A., Whyte, J., Troost, F., & Brummer, R.-J. (2016). Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*, *7*(10), e196. https://doi.org/10.1038/ctg.2016.54

Koo, J. W., Russo, S. J., Ferguson, D., Nestler, E. J., & Duman, R. S. (2010). Nuclear factor-κB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(6), 2669-2674. https://doi.org/10.1073/pnas.0910658107

Kook, S.-Y., Hong, H. S., Moon, M., Ha, C. M., Chang, S., & Mook-Jung, I. (2012). $A\beta_{1-42}$-RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca^{2+}-calcineurin signaling. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(26), 8845-8854. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6102-11.2012

Kosik, K. S. (1990). Tau protein and Alzheimer's disease. *Current Opinion in Cell Biology*, *2*(1), 101-104. https://doi.org/10.1016/S0955-0674(05)80038-9

Koyama, A., O'Brien, J., Weuve, J., Blacker, D., Metti, A. L., & Yaffe, K. (2013). The Role of Peripheral Inflammatory Markers in Dementia and Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *The Journals of Gerontology: Series A*, *68*(4), 433-440. https://doi.org/10.1093/gerona/gls187

Kozlowski, H., Janicka-Klos, A., Brasun, J., Gaggelli, E., Valensin, D., & Valensin, G. (2009). Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). *Coordination Chemistry Reviews*, *253*(21), 2665-2685. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.05.011

Krakoff, J., Funahashi, T., Stehouwer, C. D. A., Schalkwijk, C. G., Tanaka, S., Matsuzawa, Y., Kobes, S., Tataranni, P. A., Hanson, R. L., Knowler, W. C., & Lindsay, R. S. (2003). Inflammatory markers, adiponectin, and risk of type 2 diabetes in the Pima Indian. *Diabetes Care*, *26*(6), 1745-1751. https://doi.org/10.2337/diacare.26.6.1745

Kratsman, N., Getselter, D., & Elliott, E. (2016). Sodium butyrate attenuates social behavior deficits and modifies the transcription of inhibitory/excitatory genes in the frontal cortex of an autism model. *Neuropharmacology*, *102*, 136-145. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.11.003

Kriem, B., Sponne, I., Fifre, A., Malaplate-Armand, C., Lozac'h-Pillot, K., Koziel, V., Yen-Potin, F. T., Bihain, B., Oster, T., Olivier, J.-L., & Pillot, T. (2005). Cytosolic phospholipase A2 mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid-beta peptide. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *19*(1), 85-87. https://doi.org/10.1096/fj.04-1807fje

Krzysztoforska, K., Piechal, A., Blecharz-Klin, K., Pyrzanowska, J., Joniec-Maciejak, I., Mirowska-Guzel, D., & Widy-Tyszkiewicz, E. (2019). Administration of protocatechuic acid affects memory and restores hippocampal and cortical serotonin turnover in rat model of oral D-galactose-induced memory impairment. *Behavioural Brain Research*, *368*, 111896. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.04.010

Kulmacz, R. J. (1998). Cellular regulation of prostaglandin H synthase catalysis. *FEBS Letters*, *430*(3), 154-157. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00657-7

Kumar, A., Dogra, S., & Prakash, A. (2009). Effect of carvedilol on behavioral, mitochondrial dysfunction, and oxidative damage against d-galactose induced senescence in mice. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 380(5), 431 441. https://doi.org/10.1007/s00210-009-0442-8

Kummer, M. P., & Heneka, M. T. (2008). PPARs in Alzheimer's Disease. *PPAR Research*, *2008*. https://doi.org/10.1155/2008/403896

Kuo, L.-H., Hu, M.-K., Hsu, W.-M., Tung, Y.-T., Wang, B.-J., Tsai, W.-W., Yen, C.-T., & Liao, Y.-F. (2008). Tumor Necrosis Factor-α–elicited Stimulation of γ-Secretase Is Mediated by c-Jun N-terminal Kinase-dependent Phosphorylation of Presenilin and Nicastrin. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(10), 4201-4212. https://doi.org/10.1091/mbc.E07-09-0987

Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. C., & Stallings, W. C. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, *384*(6610), 644-648. https://doi.org/10.1038/384644a0

Kurz, A., Altland, K., Lautenschlager, N., Zimmer, R., Busch, R., Gerundt, I., Lauter, H., & Müller, U. (1996). Apolipoprotein E type 4 allele and Alzheimer's disease: Effect on age at onset and relative risk in different age groups. *Journal of Neurology*, *243*(6), 452-456. https://doi.org/10.1007/bf00900498

Lafleche, G., & Albert, M. (1995). Executive Function Deficits in Mild Alzheimer's Disease. *Neuropsychology*, *9*(3), 313-320.

Lambert, J.-C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M. J., Tavernier, B., Letenneur, L., Bettens, K., Berr, C., Pasquier, F., Fiévet, N., Barberger-Gateau, P., Engelborghs, S., De Deyn, P., Mateo, I., … Amouyel, P. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and

CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, *41*(10), 1094-1099. https://doi.org/10.1038/ng.439

Lashley, T., Schott, J. M., Weston, P., Murray, C. E., Wellington, H., Keshavan, A., Foti, S. C., Foiani, M., Toombs, J., Rohrer, J. D., Heslegrave, A., & Zetterberg, H. (2018). Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: Progress and prospects. *Disease Models & Mechanisms*, *11*(5), dmm031781. https://doi.org/10.1242/dmm.031781

Latham, C. F., Osborne, S. L., Cryle, M. J., & Meunier, F. A. (2007). Arachidonic acid potentiates exocytosis and allows neuronal SNARE complex to interact with Munc18a. *Journal of Neurochemistry*, *100*(6), 1543-1554. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04286.x

Latunde-Dada, G. O. (2017). Ferroptosis: Role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1861*(8), 1893-1900. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.05.019

Leblhuber, F., Geisler, S., Steiner, K., Fuchs, D., & Schütz, B. (2015). Elevated fecal calprotectin in patients with Alzheimer's dementia indicates leaky gut. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, *122*(9), 1319-1322. https://doi.org/10.1007/s00702-015-1381-9

Ledwaba, S. E., Costa, D. V. S., Bolick, D. T., Giallourou, N., Medeiros, P. H. Q. S., Swann, J. R., Traore, A. N., Potgieter, N., Nataro, J. P., & Guerrant, R. L. (2020). Enteropathogenic Escherichia coli Infection Induces Diarrhea, Intestinal Damage, Metabolic Alterations, and Increased Intestinal Permeability in a Murine Model. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 10, 595266. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.595266

Lee, S. H. (2015). Intestinal permeability regulation by tight junction: Implication on inflammatory bowel diseases. *Intestinal Research*, *13*(1), 11-18. https://doi.org/10.5217/ir.2015.13.1.11

Leung, R., Proitsi, P., Simmons, A., Lunnon, K., Güntert, A., Kronenberg, D., Pritchard, M., Tsolaki, M., Mecocci, P., Kloszewska, I., Vellas, B., Soininen, H., Wahlund, L.-O., & Lovestone, S. (2013). Inflammatory Proteins in Plasma Are Associated with Severity of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, *8*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064971

Levy, M., Thaiss, C. A., Zeevi, D., Dohnalová, L., Zilberman-Schapira, G., Mahdi, J. A., David, E., Savidor, A., Korem, T., Herzig, Y., Pevsner-Fischer, M., Shapiro, H., Christ, A., Harmelin, A., Halpern, Z., Latz, E., Flavell, R. A., Amit, I., Segal, E., & Elinav, E. (2015). Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell*, *163*(6), 1428-1443. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.048

Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D., Oshima, J., Pettingell, W., Yu, C., Jondro, P., Schmidt, S., Wang, K., & al., e. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*, *269*(5226), 973-977. https://doi.org/10.1126/science.7638622

Li, X., Wei, X., Sun, Y., Du, J., Li, X., Xun, Z., & Li, Y. C. (2019). High-fat diet promotes experimental colitis by inducing oxidative stress in the colon. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *317*(4), G453-G462. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00103.2019

Li, X.-H., Lv, B.-L., Xie, J.-Z., Liu, J., Zhou, X.-W., & Wang, J.-Z. (2012). AGEs induce Alzheimer-like tau pathology and memory deficit via RAGE-mediated GSK-3 activation. *Neurobiology of Aging*, *33*(7), 1400-1410. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.02.003

Li, Y., Liu, L., Barger, S. W., & Griffin, W. S. T. (2003). Interleukin-1 Mediates Pathological Effects of Microglia on Tau Phosphorylation and on Synaptophysin Synthesis in Cortical Neurons through a p38-MAPK Pathway. *The Journal of Neuroscience*, *23*(5), 1605-1611. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-05-01605.2003

Liao, Y.-F., Wang, B.-J., Cheng, H.-T., Kuo, L.-H., & Wolfe, M. S. (2004). Tumor Necrosis Factor-α, Interleukin-1β, and Interferon-γ Stimulate γ-Secretase-mediated Cleavage of Amyloid Precursor Protein through a JNK-dependent MAPK Pathway *. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(47), 49523-49532. https://doi.org/10.1074/jbc.M402034200

Liu, A., Ma, Y., & Zhu, Z. (2009). Protective effect of selenoarginine against oxidative stress in D-galactose-induced aging mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *73*(7), 1461-1464. https://doi.org/10.1271/bbb.80558

Liu, B., Hutchison, A. T., Thompson, C. H., Lange, K., & Heilbronn, L. K. (2019). Markers of adipose tissue inflammation are transiently elevated during intermittent fasting in women who are overweight or obese. *Obesity Research & Clinical Practice*, *13*(4), 408-415. https://doi.org/10.1016/j.orcp.2019.07.001

Liu, C., Cui, G., Zhu, M., Kang, X., & Guo, H. (2014). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *7*(12), 8342-8355.

Liu, J., Wang, F., Liu, S., Du, J., Hu, X., Xiong, J., Fang, R., Chen, W., & Sun, J. (2017). Sodium butyrate exerts protective effect against Parkinson's disease in mice via stimulation of glucagon like peptide 1. *Journal of the Neurological Sciences*, *381*, 176-181. https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.08.3235

Liu, Z., Huang, Y., Zhang, Y., Chen, D., & Zhang, Y. Q. (2011). Drosophila Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 regulates axonal transport of synaptic vesicles and is required for synaptic development and transmission. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(6), 2052-2063. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3278-10.2011

Logsdon, A. F., Erickson, M. A., Rhea, E. M., Salameh, T. S., & Banks, W. A. (2018). Gut reactions: How the blood-brain barrier connects the microbiome and the brain. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *243*(2), 159-165. https://doi.org/10.1177/1535370217743766

Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, *19*(1), 29-41. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589

Lu, J., Wu, D., Zheng, Y., Hu, B., Zhang, Z., Ye, Q., Liu, C., Shan, Q., & Wang, Y. (2010). Ursolic Acid Attenuates D-Galactose-Induced Inflammatory Response in Mouse Prefrontal Cortex through Inhibiting AGEs/RAGE/NF-κB Pathway Activation. Cerebral Cortex, 20(11), 2540 2548. https://doi.org/10.1093/cercor/bhq002

Luchsinger, J. A., Tang, M.-X., Shea, S., & Mayeux, R. (2004). Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology*, *63*(7), 1187-1192. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000140292.04932.87

Lukiw, W. J. (2016). Bacteroides fragilis Lipopolysaccharide and Inflammatory Signaling in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Microbiology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01544

Lynch, M. A., Clements, M. P., Voss, K. L., Bramham, C. R., & Bliss, T. V. (1991). Is arachidonic acid a retrograde messenger in long-term potentiation? *Biochemical Society Transactions*, *19*(2), 391-396. https://doi.org/10.1042/bst0190391

Lyte, M. (2014). Microbial endocrinology. *Gut Microbes*, *5*(3), 381-389. https://doi.org/10.4161/gmic.28682

Ma, B. W., Bokulich, N. A., Castillo, P. A., Kananurak, A., Underwood, M. A., Mills, D. A., & Bevins, C. L. (2012). Routine Habitat Change: A Source of Unrecognized Transient Alteration of Intestinal Microbiota in Laboratory Mice. *PLOS ONE*, *7*(10), e47416. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047416

Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pesoa, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R. (2020). The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients*, *12*(5), 1474. https://doi.org/10.3390/nu12051474

Makwana, M., Jones, L. L., Cuthill, D., Heuer, H., Bohatschek, M., Hristova, M., Friedrichsen, S., Ormsby, I., Bueringer, D., Koppius, A., Bauer, K., Doetschman, T., & Raivich, G. (2007). Endogenous Transforming Growth Factor β1 Suppresses Inflammation and Promotes Survival in Adult CNS. Journal of Neuroscience, 27(42), 11201-11213. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2255-07.2007

Malaplate-Armand, C., Florent-Béchard, S., Youssef, I., Koziel, V., Sponne, I., Kriem, B., Leininger-Muller, B., Olivier, J.-L., Oster, T., & Pillot, T. (2006). Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. *Neurobiology of Disease*, *23*(1), 178-189. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.02.010

Man, S. M. (2018). Inflammasomes in the gastrointestinal tract: Infection, cancer and gut microbiota homeostasis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *15*(12), 721-737. https://doi.org/10.1038/s41575-018-0054-1

Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M. C., Mollet, B., & Poolman, B. (1997). Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(22), 14277-14284. https://doi.org/10.1074/jbc.272.22.14277

Marco, S., & Skaper, S. D. (2006). Amyloid beta-peptide1-42 alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells. *Neuroscience Letters*, *401*(3), 219-224. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.03.047

Marinelli, L., Martin-Gallausiaux, C., Bourhis, J.-M., Béguet-Crespel, F., Blottière, H. M., & Lapaque, N. (2019). Identification of the novel role of butyrate as AhR ligand in human intestinal epithelial cells. *Scientific Reports*, *9*(1), 643. https://doi.org/10.1038/s41598-018-37019-2

Markesbery, W. R. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine*, *23*(1), 134-147. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00629-6

Markesbery, W. R. (1999). The role of oxidative stress in Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, *56*(12), 1449-1452. https://doi.org/10.1001/archneur.56.12.1449

Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M.-L., Yardin, C., & Terro, F. (2013). Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, *12*(1), 289-309. https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.06.003

Martin-Jiménez, C. A., Gaitán-Vaca, D. M., Echeverria, V., González, J., & Barreto, G. E. (2017). Relationship Between Obesity, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease: An Astrocentric View. *Molecular Neurobiology*, *54*(9), 7096-7115. https://doi.org/10.1007/s12035-016-0193-8

Masarone, M., Rosato, V., Dallio, M., Gravina, A. G., Aglitti, A., Loguercio, C., Federico, A., & Persico, M. (2018). Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2018*. https://doi.org/10.1155/2018/9547613

Mascanfroni, I. D., Takenaka, M. C., Yeste, A., Patel, B., Wu, Y., Kenison, J. E., Siddiqui, S., Basso, A. S., Otterbein, L. E., Pardoll, D. M., Pan, F., Priel, A., Clish, C. B., Robson, S. C., & Quintana, F. J. (2015). Metabolic control of type 1 regulatory T cell

differentiation by AHR and HIF1-α. *Nature Medicine*, *21*(6), 638-646. https://doi.org/10.1038/nm.3868

Mater, D. D. G., Drouault-Holowacz, S., Oozeer, R., Langella, P., Anba, J., & Corthier, G. (2006). Beta-galactosidase production by Streptococcus thermophilus is higher in the small intestine than in the caecum of human-microbiota-associated mice after lactose supplementation. *The British Journal of Nutrition*, *96*(1), 177-181. https://doi.org/10.1079/bjn20061724

Mathieu, P., Piantanida, A. P., & Pitossi, F. (2010). Chronic Expression of Transforming Growth Factor-Beta Enhances Adult Neurogenesis. *Neuroimmunomodulation*, *17*(3), 200-201. https://doi.org/10.1159/000258723

Mayer, E. A., Tillisch, K., & Gupta, A. (2015, mars 2). *Gut/brain axis and the microbiota*. American Society for Clinical Investigation. https://doi.org/10.1172/JCI76304

McGeer, P. L., Itagaki, S., Tago, H., & McGeer, E. G. (1987). Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neuroscience Letters*, *79*(1-2), 195-200. https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90696-3

McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2007). NSAIDs and Alzheimer disease: Epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiology of Aging*, *28*(5), 639-647. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.03.013

McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, *34*(7), 939-944. https://doi.org/10.1212/wnl.34.7.939

McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S., & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, *7*(3), 263-269. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One*, *8*(4), e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217

Meirer, K., Steinhilber, D., & Proschak, E. (2014). Inhibitors of the arachidonic acid cascade: Interfering with multiple pathways. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *114*(1), 83-91. https://doi.org/10.1111/bcpt.12134

Meloni, I., Parri, V., De Filippis, R., Ariani, F., Artuso, R., Bruttini, M., Katzaki, E., Longo, I., Mari, F., Bellan, C., Dotti, C. G., & Renieri, A. (2009). The XLMR gene ACSL4 plays a role in dendritic spine architecture. *Neuroscience*, *159*(2), 657-669. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.11.056

Ménard, S., Cerf-Bensussan, N., & Heyman, M. (2010). Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunology*, *3*(3), 247-259. https://doi.org/10.1038/mi.2010.5

Miclo, L., Roux, E., Genay, M., Brusseaux, E., Poirson, C., Jameh, N., Perrin, C., & Dary, A. (2012). Variability of hydrolysis of β-, αs1-, and αs2-caseins by 10 strains of Streptococcus thermophilus and resulting bioactive peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(2), 554-565. https://doi.org/10.1021/jf202176d

Middleton, L. E., & Yaffe, K. (2009). Promising Strategies for the Prevention of Dementia. *Archives of Neurology*, *66*(10). https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.201

Minter, M. R., Zhang, C., Leone, V., Ringus, D. L., Zhang, X., Oyler-Castrillo, P., Musch, M. W., Liao, F., Ward, J. F., Holtzman, D. M., Chang, E. B., Tanzi, R. E., & Sisodia, S. S. (2016). Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, *6*(1), 30028. https://doi.org/10.1038/srep30028

Mion, F., D'Incà, F., Danelli, L., Toffoletto, B., Guarnotta, C., Frossi, B., Burocchi, A., Rigoni, A., Gerdes, N., Lutgens, E., Tripodo, C., Colombo, M. P., Rivera, J., Vitale, G., & Pucillo, C. E. (2014). Mast Cells Control the Expansion and Differentiation of IL-10–Competent B Cells. *The Journal of Immunology*, *193*(9), 4568-4579. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302593

Miura, T., Suzuki, K., Kohata, N., & Takeuchi, H. (2000). Metal binding modes of Alzheimer's amyloid beta-peptide in insoluble aggregates and soluble complexes. *Biochemistry*, *39*(23), 7024-7031. https://doi.org/10.1021/bi0002479

Moghadasian, M. H. (2008). Advances in dietary enrichment with n-3 fatty acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *48*(5), 402-410. https://doi.org/10.1080/10408390701424303

Mohri, I., Kadoyama, K., Kanekiyo, T., Sato, Y., Kagitani-Shimono, K., Saito, Y., Suzuki, K., Kudo, T., Takeda, M., Urade, Y., Murayama, S., & Taniike, M. (2007). Hematopoietic prostaglandin D synthase and DP1 receptor are selectively upregulated in microglia and astrocytes within senile plaques from human patients and in a mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *66*(6), 469-480. https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000240472.43038.27

Monteleone, I., Rizzo, A., Sarra, M., Sica, G., Sileri, P., Biancone, L., MacDonald, T. T., Pallone, F., & Monteleone, G. (2011). Aryl Hydrocarbon Receptor-Induced Signals Up-regulate IL-22 Production and Inhibit Inflammation in the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology*, *141*(1), 237-248.e1. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.007

Moore, A. H., & O'Banion, M. K. (2002). Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *54*(12), 1627-1656. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00162-X

Morava, E. (2014). Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency; review and outlook for a novel treatable CDG. *Molecular Genetics and Metabolism*, *112*(4), 275-279. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.06.002

Mori, N., Horie, Y., Gerritsen, M. E., Anderson, D. C., & Granger, D. N. (1999). Anti-inflammatory drugs and endothelial cell adhesion molecule expression in murine vascular beds. *Gut*, *44*(2), 186-195. https://doi.org/10.1136/gut.44.2.186

Morris, M. C., Evans, D. A., Tangney, C. C., Bienias, J. L., & Wilson, R. S. (2006). Associations of vegetable and fruit consumption with age-related cognitive change. *Neurology*, *67*(8), 1370-1376. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000240224.38978.d8

Morris, M. C., Tangney, C. C., Wang, Y., Sacks, F. M., Bennett, D. A., & Aggarwal, N. T. (2015). MIND diet associated with reduced incidence of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *11*(9), 1007-1014. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.11.009

Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *11*(1), 47-60. https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4

Mortha, A., Chudnovskiy, A., Hashimoto, D., Bogunovic, M., Spencer, S. P., Belkaid, Y., & Merad, M. (2014). Microbiota-Dependent Crosstalk Between Macrophages and ILC3 Promotes Intestinal Homeostasis. *Science*, *343*(6178). https://doi.org/10.1126/science.1249288

Myers, R. H., Schaefer, E. J., Wilson, P. W., D'Agostino, R., Ordovas, J. M., Espino, A., Au, R., White, R. F., Knoefel, J. E., Cobb, J. L., McNulty, K. A., Beiser, A., & Wolf, P. A.

(1996). Apolipoprotein E epsilon4 association with dementia in a population-based study: The Framingham study. *Neurology*, *46*(3), 673-677. https://doi.org/10.1212/wnl.46.3.673

Naderali, E. K., Ratcliffe, S. H., & Dale, M. C. (2009). Review: Obesity and Alzheimer's Disease: A Link Between Body Weight and Cognitive Function in Old Age. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementiasr*, *24*(6), 445-449. https://doi.org/10.1177/1533317509348208

Nakamura, K., & Hasegawa, H. (2009). Production and Peripheral Roles of 5-HTP, a Precursor of Serotonin. *International Journal of Tryptophan Research*, *2*, IJTR.S1022. https://doi.org/10.4137/IJTR.S1022

Nameni, G., Farhangi, M. A., Hajiluian, G., Shahabi, P., & Abbasi, M. M. (2017). Insulin deficiency: A possible link between obesity and cognitive function. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *59*, 15-20. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.02.008

Néri, C., & Ségalat, L. (2003). C. elegans comme modèle pour les maladies dégénératives héréditaires humaines. *Médecine/sciences*, *19*(12), 1218-1225. https://doi.org/10.1051/medsci/200319121218

Niemantsverdriet, E., Ottoy, J., Somers, C., De Roeck, E., Struyfs, H., Soetewey, F., Verhaeghe, J., Van den Bossche, T., Van Mossevelde, S., Goeman, J., De Deyn, P. P., Mariën, P., Versijpt, J., Sleegers, K., Van Broeckhoven, C., Wyffels, L., Albert, A., Ceyssens, S., Stroobants, S., … Engelborghs, S. (2017). The Cerebrospinal Fluid Aβ1–42/Aβ1–40 Ratio Improves Concordance with Amyloid-PET for Diagnosing Alzheimer's Disease in a Clinical Setting. *Journal of Alzheimer's Disease*, *60*(2), 561-576. https://doi.org/10.3233/JAD-170327

Nimgampalle, M., & Kuna, Y. (2017). Anti-Alzheimer Properties of Probiotic, Lactobacillus plantarum MTCC 1325 in Alzheimer's Disease induced Albino Rats. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, *11*(8), KC01-KC05. https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/26106.10428

Nisbet, R. M., Polanco, J.-C., Ittner, L. M., & Götz, J. (2015). Tau aggregation and its interplay with amyloid-β. *Acta Neuropathologica*, *129*, 207-220. https://doi.org/10.1007/s00401-014-1371-2

Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J.-Z., Abe, F., & Osawa, R. (2016). Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: A cross-sectional study. *BMC Microbiology*, *16*, 90. https://doi.org/10.1186/s12866-016-0708-5

Ogden, C. L., Carroll, M. D., & Flegal, K. M. (2008). High body mass index for age among US children and adolescents, 2003-2006. *JAMA*, *299*(20), 2401-2405. https://doi.org/10.1001/jama.299.20.2401

Ogrinc Wagner, A., Friedrich, V., Barthels, C., Marconi, P., Blutke, A., Brombacher, F., & Brocker, T. (2019). Strain specific maturation of Dendritic cells and production of IL-1β controls CD40-driven colitis. *PLOS ONE*, *14*(1), e0210998. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210998

Ohta, H., Morita, T., Yokoyama, N., Osuga, T., Sasaki, N., Morishita, K., Nakamura, K., & Takiguchi, M. (2017). Serial measurement of pancreatic lipase immunoreactivity concentration in dogs with immune-mediated disease treated with prednisolone. *Journal of Small Animal Practice*, *58*(6), 342-347. https://doi.org/10.1111/jsap.12652

O'Leary, O. F., Ogbonnaya, E. S., Felice, D., Levone, B. R., C. Conroy, L., Fitzgerald, P., Bravo, J. A., Forsythe, P., Bienenstock, J., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2018). The vagus nerve modulates BDNF expression and neurogenesis in the hippocampus.

European Neuropsychopharmacology, *28*(2), 307-316. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.12.004

Ouchi, N., & Walsh, K. (2007). Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *380*(1-2), 24-30. https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.01.026

Pal, A., Badyal, R. K., Vasishta, R. K., Attri, S. V., Thapa, B. R., & Prasad, R. (2013). Biochemical, histological, and memory impairment effects of chronic copper toxicity: A model for non-Wilsonian brain copper toxicosis in Wistar rat. *Biological Trace Element Research*, *153*(1-3), 257-268. https://doi.org/10.1007/s12011-013-9665-0

Pandini, G., Pace, V., Copani, A., Squatrito, S., Milardi, D., & Vigneri, R. (2013). Insulin has multiple antiamyloidogenic effects on human neuronal cells. *Endocrinology*, *154*(1), 375-387. https://doi.org/10.1210/en.2012-1661

Papalini, S., Michels, F., Kohn, N., Wegman, J., van Hemert, S., Roelofs, K., Arias-Vasquez, A., & Aarts, E. (2019). Stress matters: Randomized controlled trial on the effect of probiotics on neurocognition. *Neurobiology of Stress*, *10*, 100141. https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2018.100141

Park, J. C., & Im, S.-H. (2020). Of men in mice: The development and application of a humanized gnotobiotic mouse model for microbiome therapeutics. *Experimental & Molecular Medicine*, *52*(9), 1383-1396. https://doi.org/10.1038/s12276-020-0473-2

Patnala, R., Arumugam, T. V., Gupta, N., & Dheen, S. T. (2017). HDAC Inhibitor Sodium Butyrate-Mediated Epigenetic Regulation Enhances Neuroprotective Function of Microglia During Ischemic Stroke. *Molecular Neurobiology*, *54*(8), 6391-6411. https://doi.org/10.1007/s12035-016-0149-z

Pearce, J. (1985). Dementia: A Survey of the syndrome of Dementia. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *48*(2), 196.

Pecchi, E., Dallaporta, M., Jean, A., Thirion, S., & Troadec, J.-D. (2009). Prostaglandins and sickness behavior: Old story, new insights. *Physiology & Behavior*, *97*(3-4), 279-292. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.040

Pellegrini, C., Antonioli, L., Calderone, V., Colucci, R., Fornai, M., & Blandizzi, C. (2020). Microbiota-gut-brain axis in health and disease: Is NLRP3 inflammasome at the crossroads of microbiota-gut-brain communications? Progress in Neurobiology, 191, 101806. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101806

Peng, X., Meng, J., Chi, T., Liu, P., Man, C., Liu, S., Guo, Y., & Jiang, Y. (2014). Lactobacillus plantarum NDC 75017 alleviates the learning and memory ability in aging rats by reducing mitochondrial dysfunction. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *8*(6), 1841-1846. https://doi.org/10.3892/etm.2014.2000

Pérez-Chacón, G., Astudillo, A. M., Ruipérez, V., Balboa, M. A., & Balsinde, J. (2010). Signaling role for lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 in receptor-regulated arachidonic acid reacylation reactions in human monocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *184*(2), 1071-1078. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902257

Pérez-González, R., Antequera, D., Vargas, T., Spuch, C., Bolós, M., & Carro, E. (2011). Leptin induces proliferation of neuronal progenitors and neuroprotection in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *24 Suppl 2*, 17-25. https://doi.org/10.3233/JAD-2011-102070

Perry, R. J., & Hodges, J. R. (1999). Attention and executive deficits in Alzheimer's disease. A critical review. *Brain: A Journal of Neurology*, *122 (Pt 3)*, 383-404. https://doi.org/10.1093/brain/122.3.383

Peters, M., Jacobs, S., Ehlers, M., Vollmer, P., Müllberg, J., Wolf, E., Brem, G., Meyer zum Büschenfelde, K. H., & Rose-John, S. (1996). The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: Sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice

towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *The Journal of Experimental Medicine*, *183*(4), 1399-1406. https://doi.org/10.1084/jem.183.4.1399

Peters, M., Schirmacher, P., Goldschmitt, J., Odenthal, M., Peschel, C., Fattori, E., Ciliberto, G., Dienes, H. P., Meyer zum Büschenfelde, K. H., & Rose-John, S. (1997). Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in interleukin (IL)-6-sIL-6R double transgenic mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *185*(4), 755-766. https://doi.org/10.1084/jem.185.4.755

Petersson, S. D., & Philippou, E. (2016). Mediterranean Diet, Cognitive Function, and Dementia: A Systematic Review of the Evidence. *Advances in Nutrition*, *7*(5), 889-904. https://doi.org/10.3945/an.116.012138

Pflanzner, T., Kuhlmann, C. R., & Pietrzik, C. U. (2010). Blood-brain-barrier models for the investigation of transporter- and receptor-mediated amyloid-β clearance in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, *7*(7), 578-590. https://doi.org/10.2174/156720510793499066

Phillis, J. W., Horrocks, L. A., & Farooqui, A. A. (2006). Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: Their role and involvement in neurological disorders. *Brain Research Reviews*, *52*(2), 201-243. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.02.002

Pinchaud, K., Maguin-Gaté, K., & Olivier, J.-L. (2018). Dietary arachidonic acid: A Janus face actor in brain and Alzheimer's disease? *OCL*, *25*(4), D406. https://doi.org/10.1051/ocl/2018033

Pistollato, F., Sumalla Cano, S., Elio, I., Masias Vergara, M., Giampieri, F., & Battino, M. (2016). Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *Nutrition Reviews*, *74*(10), 624-634. https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw023

Platten, M., Nollen, E. A. A., Röhrig, U. F., Fallarino, F., & Opitz, C. A. (2019). Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*, *18*(5), 379-401. https://doi.org/10.1038/s41573-019-0016-5

Poeckel, D., & Funk, C. D. (2010). The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in preclinical models of cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, *86*(2), 243-253. https://doi.org/10.1093/cvr/cvq016

Poirier, J., Bertrand, P., Poirier, J., Kogan, S., Gauthier, S., Poirier, J., Gauthier, S., Davignon, J., Bouthillier, D., & Davignon, J. (1993). Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *The Lancet*, *342*(8873), 697-699. https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91705-Q

Poirier, J., Miron, J., Picard, C., Gormley, P., Théroux, L., Breitner, J., & Dea, D. (2014). Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *35 Suppl 2*, S3-10. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.037

Poret, J. M., Souza-Smith, F., Marcell, S. J., Gaudet, D. A., Tzeng, T. H., Braymer, H. D., Harrison-Bernard, L. M., & Primeaux, S. D. (2018). High fat diet consumption differentially affects adipose tissue inflammation and adipocyte size in obesity-prone and obesity-resistant rats. *International journal of obesity (2005)*, *42*(3), 535-541. https://doi.org/10.1038/ijo.2017.280

Potgieter, M., Bester, J., Kell, D. B., & Pretorius, E. (2015). The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(4), 567-591. https://doi.org/10.1093/femsre/fuv013

Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E., & Ridker, P. M. (2001). C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, *286*(3), 327-334. https://doi.org/10.1001/jama.286.3.327

Pugazhenthi, S., Qin, L., & Reddy, P. H. (2017). Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, *1863*(5), 1037-1045. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.04.017

Puig, K. L., Lutz, B. M., Urquhart, S. A., Rebel, A. A., Zhou, X., Manocha, G. D., Sens, M., Tuteja, A. K., Foster, N. L., & Combs, C. K. (2015). Overexpression of mutant amyloid-β protein precursor and presenilin 1 modulates enteric nervous system. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *44*(4), 1263-1278. https://doi.org/10.3233/JAD-142259

Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, *362*(4), 329-344. https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142

Qi, H., Wei, J., Gao, Y., Yang, Y., Li, Y., Zhu, H., Su, L., Su, X., Zhang, Y., & Yang, R. (2020). Reg4 and complement factor D prevent the overgrowth of E. coli in the mouse gut. Communications Biology, 3(1), 483. https://doi.org/10.1038/s42003-020-01219-2

Quinn, J. F., Raman, R., Thomas, R. G., Yurko-Mauro, K., Nelson, E. B., Van Dyck, C., Galvin, J. E., Emond, J., Jack, C. R., Weiner, M., Shinto, L., & Aisen, P. S. (2010). Docosahexaenoic Acid Supplementation and Cognitive Decline in Alzheimer Disease. *Jama*, *304*(17), 1903-1911. https://doi.org/10.1001/jama.2010.1510

Rafii, M. S., & Aisen, P. S. (2015). Advances in Alzheimer's disease drug development. *BMC Medicine*, *13*, 62. https://doi.org/10.1186/s12916-015-0297-4

Ramírez, G., Rey, S., & von Bernhardi, R. (2008). Proinflammatory stimuli are needed for induction of microglial cell-mediated AbetaPP and Abeta-neurotoxicity in hippocampal cultures. Journal of Alzheimer's Disease: JAD, 15(1), 45-59. https://doi.org/10.3233/jad-2008-15104

Ransohoff, R. M., & Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews. Immunology*, *12*(9), 623-635. https://doi.org/10.1038/nri3265

Rao, M., & Gershon, M. D. (2016). The bowel and beyond: The enteric nervous system in neurological disorders. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, *13*(9), 517-528. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.107

Rao, R. (2009). OCCLUDIN PHOSPHORYLATION IN REGULATION OF EPITHELIAL TIGHT JUNCTIONS. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1165*, 62-68. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04054.x

Razay, G., & Wilcock, G. K. (1994). Hyperinsulinaemia and Alzheimer's disease. *Age and Ageing*, *23*(5), 396-399. https://doi.org/10.1093/ageing/23.5.396

Rehman, S. U., Shah, S. A., Ali, T., Chung, J. I., & Kim, M. O. (2017). Anthocyanins Reversed D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation Mediated Cognitive Impairment in Adult Rats. *Molecular Neurobiology*, *54*(1), 255-271. https://doi.org/10.1007/s12035-015-9604-5

Reichardt, F., Chassaing, B., Nezami, B. G., Li, G., Tabatabavakili, S., Mwangi, S., Uppal, K., Liang, B., Vijay-Kumar, M., Jones, D., Gewirtz, A. T., & Srinivasan, S. (2017). Western diet induces colonic nitrergic myenteric neuropathy and dysmotility in mice via saturated fatty acid- and lipopolysaccharide-induced TLR4 signalling. *The Journal of Physiology*, *595*(5), 1831-1846. https://doi.org/10.1113/JP273269

Reichardt, N., Duncan, S. H., Young, P., Belenguer, A., McWilliam Leitch, C., Scott, K. P., Flint, H. J., & Louis, P. (2014). Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *The ISME Journal*, *8*(6), 1323-1335. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.14

Reigstad, C. S., Salmonson, C. E., Iii, J. F. R., Szurszewski, J. H., Linden, D. R., Sonnenburg, J. L., Farrugia, G., & Kashyap, P. C. (2015). Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *The FASEB Journal*, *29*(4), 1395-1403. https://doi.org/10.1096/fj.14-259598

Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, *88*(4), 640-651. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024

Rickman, C., & Davletov, B. (2005). Arachidonic acid allows SNARE complex formation in the presence of Munc18. *Chemistry & Biology*, *12*(5), 545-553. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.03.004

Rinaldo-Matthis, A., & Haeggström, J. Z. (2010). Structures and mechanisms of enzymes in the leukotriene cascade. *Biochimie*, *92*(6), 676-681. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.01.010

Rodríguez, C., Medici, M., Mozzi, F., & Font de Valdez, G. (2010). Therapeutic effect of Streptococcus thermophilus CRL 1190-fermented milk on chronic gastritis. *World Journal of Gastroenterology*, *16*(13), 1622-1630. https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i13.1622

Rodríguez, C., Medici, M., Rodríguez, A. V., Mozzi, F., & Font de Valdez, G. (2009). Prevention of chronic gastritis by fermented milks made with exopolysaccharide-producing Streptococcus thermophilus strains. *Journal of Dairy Science*, *92*(6), 2423-2434. https://doi.org/10.3168/jds.2008-1724

Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Garrido-Mesa, J., Vezza, T., Utrilla, M. P., Chueca, N., Fernández-Caballero, J. A., García, F., Rodríguez-Cabezas, M. E., & Gálvez, J. (2018). The Administration of Escherichia coli Nissle 1917 Ameliorates Development of DSS-Induced Colitis in Mice. Frontiers in Pharmacology, 9, 468. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00468

Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Sorbi, S., Nacmias, B., Piacentini, S., Amaducci, L., Chumakov, I., Cohen, D., Lannfelt, L., Fraser, P. E., … George-Hyslop, P. H. S. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, *376*(6543), 775-778. https://doi.org/10.1038/376775a0

Ronchi, G., Ryu, V., Fornaro, M., & Czaja, K. (2012). Hippocampal plasticity after a vagus nerve injury in the rat. *Neural Regeneration Research*, *7*(14), 1055-1063. https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2012.14.003

Rose-John, S., & Heinrich, P. C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors: Generation and biological function. *Biochemical Journal*, *300*(2), 281-290. https://doi.org/10.1042/bj3000281

Roseth, S., Fykse, E. M., & Fonnum, F. (1998). The effect of arachidonic acid and free fatty acids on vesicular uptake of glutamate and gamma-aminobutyric acid. *European Journal of Pharmacology*, *341*(2-3), 281-288. https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)01449-0

Roshchina, V. V. (2010). Evolutionary Considerations of Neurotransmitters in Microbial, Plant, and Animal Cells. In M. Lyte & P. P. E. Freestone (Éds.), *Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health* (p. 17-52). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5576-0_2

Rossi, D., & Zlotnik, A. (2000). The Biology of Chemokines and their Receptors. *Annual Review of Immunology*, *18*(1), 217-242. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.217

Rothaug, M., Becker-Pauly, C., & Rose-John, S. (2016). The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1863(6, Part A), 1218 1227. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.018

Rothhammer, V., Mascanfroni, I. D., Bunse, L., Takenaka, M. C., Kenison, J. E., Mayo, L., Chao, C.-C., Patel, B., Yan, R., Blain, M., Alvarez, J. I., Kébir, H., Anandasabapathy,

N., Izquierdo, G., Jung, S., Obholzer, N., Pochet, N., Clish, C. B., Prinz, M., … Quintana, F. J. (2016). Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nature Medicine*, *22*(6), 586-597. https://doi.org/10.1038/nm.4106

Rozemuller, J. M., van der Valk, P., & Eikelenboom, P. (1992). Activated microglia and cerebral amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Research in Immunology*, *143*(6), 646-649. https://doi.org/10.1016/0923-2494(92)80050-u

Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., & Freeman, B. A. (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(42), 26066-26075.

Rul, F., Ben-Yahia, L., Chegdani, F., Wrzosek, L., Thomas, S., Noordine, M.-L., Gitton, C., Cherbuy, C., Langella, P., & Thomas, M. (2011). Impact of the Metabolic Activity of Streptococcus thermophilus on the Colon Epithelium of Gnotobiotic Rats. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(12), 10288-10296. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.168666

Rup, L. (2012). The Human Microbiome Project. *Indian Journal of Microbiology*, *52*(3), 315-315. https://doi.org/10.1007/s12088-012-0304-9

Sacks, F. M., Svetkey, L. P., Vollmer, W. M., Appel, L. J., Bray, G. A., Harsha, D., Obarzanek, E., Conlin, P. R., Miller, E. R., Simons-Morton, D. G., Karanja, N., Lin, P.-H., Aickin, M., Most-Windhauser, M. M., Moore, T. J., Proschan, M. A., & Cutler, J. A. (2001). Effects on Blood Pressure of Reduced Dietary Sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Diet. *New England Journal of Medicine*, *344*(1), 3-10. https://doi.org/10.1056/NEJM200101043440101

Salkovic-Petrisic, M., Osmanovic-Barilar, J., Knezovic, A., Hoyer, S., Mosetter, K., & Reutter, W. (2014). Long-term oral galactose treatment prevents cognitive deficits in male Wistar rats treated intracerebroventricularly with streptozotocin. *Neuropharmacology*, *77*, 68-80. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.09.002

Salonen, A., Lahti, L., Salojärvi, J., Holtrop, G., Korpela, K., Duncan, S. H., Date, P., Farquharson, F., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Louis, P., Flint, H. J., & de Vos, W. M. (2014). Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *The ISME Journal*, *8*(11), 2218-2230. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.63

Sanchez-Mejia, R. O., Newman, J. W., Toh, S., Yu, G.-Q., Zhou, Y., Halabisky, B., Cissé, M., Scearce-Levie, K., Cheng, I. H., Gan, L., Palop, J. J., Bonventre, J. V., & Mucke, L. (2008). Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, *11*(11), 1311-1318. https://doi.org/10.1038/nn.2213

Sansonetti, P. J. (2001). Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by Shigella, making sense of prokaryote–eukaryote cross-talks11This paper was given as the inaugural Lwoff Medal Lecture at the Jubilee Ceremony for the 25th anniversary of FEMS, Sevilla, Spain, on 16 September 2000. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*(1), 3-14. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00060-7

Santos, C. Y., Snyder, P. J., Wu, W.-C., Zhang, M., Echeverria, A., & Alber, J. (2017). Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, *7*(1), 69-87. https://doi.org/10.1016/j.dadm.2017.01.005

Sasaki, N., Toki, S., Chowei, H., Saito, T., Nakano, N., Hayashi, Y., Takeuchi, M., & Makita, Z. (2001). Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease. *Brain Research*, *888*(2), 256-262. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03075-4

Sastre, M., Dewachter, I., Landreth, G. E., Willson, T. M., Klockgether, T., van Leuven, F., & Heneka, M. T. (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(30), 9796-9804.

Saunders, N. R., Daneman, R., Dziegielewska, K. M., & Liddelow, S. A. (2013). Transporters of the blood-brain and blood-CSF interfaces in development and in the adult. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(2-3), 742-752. https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.11.006

Savignac, H. M., Tramullas, M., Kiely, B., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Bifidobacteria modulate cognitive processes in an anxious mouse strain. *Behavioural Brain Research*, *287*, 59-72. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.044

Scarmeas, N., Luchsinger, J. A., Mayeux, R., & Stern, Y. (2007). Mediterranean diet and Alzheimer disease mortality. *Neurology*, *69*(11), 1084-1093. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000277320.50685.7c

Scarmeas, N., Luchsinger, J. A., Schupf, N., Brickman, A. M., Cosentino, S., Tang, M. X., & Stern, Y. (2009). Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA*, *302*(6), 627-637. https://doi.org/10.1001/jama.2009.1144

Scarmeas, N., Stern, Y., Tang, M.-X., Mayeux, R., & Luchsinger, J. A. (2006). Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, *59*(6), 912-921. https://doi.org/10.1002/ana.20854

Schaloske, R. H., & Dennis, E. A. (2006). The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1761*(11), 1246-1259. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.011

Schelke, M. W., Hackett, K., Chen, J. L., Shih, C., Shum, J., Montgomery, M. E., Chiang, G. C., Berkowitz, C., Seifan, A., Krikorian, R., & Isaacson, R. S. (2016). Nutritional interventions for Alzheimer's prevention: A clinical precision medicine approach. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1367*(1), 50-56. https://doi.org/10.1111/nyas.13070

Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M. B., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S., & Van der Flier, W. M. (2016). Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, *388*(10043), 505-517. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01124-1

Schlezinger, J. J., Jensen, B. A., Mann, K. K., Ryu, H.-Y., & Sherr, D. H. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated NF-kappa B activation and apoptosis in pre-B cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *169*(12), 6831-6841. https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.12.6831

Schmitz, D., Breustedt, J., & Gundlfinger, A. (2014). Retrograde signaling causes excitement. *Neuron*, *81*(4), 717-719. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.003

Schraen-Maschke, S., Sergeant, N., Dhaenens, C.-M., Bombois, S., Deramecourt, V., Caillet-Boudin, M.-L., Pasquier, F., Maurage, C.-A., Sablonnière, B., Vanmechelen, E., & Buée, L. (2008). Tau as a biomarker of neurodegenerative diseases. *Biomarkers in Medicine*, *2*(4), 363-384. https://doi.org/10.2217/17520363.2.4.363

Scientific comittee for food. (1993). Proposed nutrient and energy intakes for the European community: A report of the Scientific Committee for Food of the European community. *Nutrition Reviews*, *51*(7), 209-212. https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1993.tb03106.x

Selkoe, D. J. (1997). Alzheimer's disease: Genotypes, phenotypes, and treatments. *Science (New York, N.Y.), 275*(5300), 630-631. https://doi.org/10.1126/science.275.5300.630

Seshadri, S., Fitzpatrick, A. L., Arfan Ikram, M., DeStefano, A. L., Gudnason, V., Boada, M., Bis, J. C., Smith, A. V., Carassquillo, M. M., Charles Lambert, J., Harold, D., Schrijvers, E. M. C., Ramirez-Lorca, R., Debette, S., Longstreth, W. T., Janssens, A. C. J. W., Shane Pankratz, V., Dartigues, J. F., Hollingworth, P., … Breteler, M. M. B. (2010). Genome-wide Analysis of Genetic Loci Associated with Alzheimer's Disease. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, *303*(18), 1832-1840. https://doi.org/10.1001/jama.2010.574

Shaftel, S. S., Kyrkanides, S., Olschowka, J. A., Miller, J. H., Johnson, R. E., & O'Banion, M. K. (2007). Sustained hippocampal IL-1β overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(6), 1595-1604. https://doi.org/10.1172/JCI31450

Shamsipour, S., Sharifi, G., & Taghian, F. (2021). An 8-Week Administration of Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus plantarum Combined with Exercise Training Alleviates Neurotoxicity of Aβ and Spatial Learning via Acetylcholine in Alzheimer Rat Model. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*. https://doi.org/10.1007/s12031-021-01812-y

Shankle, W. R., Landing, B. H., Ang, S. M., Chui, H., Villarreal-Engelhardt, G., & Zarow, C. (1993). Studies of the enteric nervous system in Alzheimer disease and other dementias of the elderly: Enteric neurons in Alzheimer disease. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *6*(1), 10-14.

Shi, J., Wang, Q., Johansson, J. U., Liang, X., Woodling, N. S., Priyam, P., Loui, T. M., Merchant, M., Breyer, R. M., Montine, T. J., & Andreasson, K. (2012). Inflammatory prostaglandin E2 signaling in a mouse model of Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, *72*(5), 788-798. https://doi.org/10.1002/ana.23677

Shimada, Y., Kinoshita, M., Harada, K., Mizutani, M., Masahata, K., Kayama, H., & Takeda, K. (2013). Commensal Bacteria-Dependent Indole Production Enhances Epithelial Barrier Function in the Colon. *PLOS ONE*, *8*(11), e80604. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080604

Shin, H. C., Jo, B. G., Lee, C.-Y., Lee, K.-W., & Namgung, U. (2019). Hippocampal activation of 5-HT1B receptors and BDNF production by vagus nerve stimulation in rats under chronic restraint stress. *European Journal of Neuroscience*, *50*(1), 1820-1830. https://doi.org/10.1111/ejn.14368

Shindou, H., Hishikawa, D., Harayama, T., Eto, M., & Shimizu, T. (2013). Generation of membrane diversity by lysophospholipid acyltransferases. *Journal of Biochemistry*, *154*(1), 21-28. https://doi.org/10.1093/jb/mvt048

Shishov, V. A., Kirovskaia, T. A., Kudrin, V. S., & Oleskin, A. V. (2009). [Amine neuromediators, their precursors, and oxidation products in the culture of Escherichia coli K-12]. *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiia*, *45*(5), 550-554.

Shwe, T., Pratchayasakul, W., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2018). Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. *Experimental Gerontology*, *101*, 13-36. https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.029

Simopoulos, A. P. (2016). An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, *8*(3), 128. https://doi.org/10.3390/nu8030128

Sims-Robinson, C., Kim, B., Rosko, A., & Feldman, E. L. (2010). How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? *Nature Reviews Neurology*, *6*(10), 551-559. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.130

Singh, B., Parsaik, A. K., Mielke, M. M., Erwin, P. J., Knopman, D. S., Petersen, R. C., & Roberts, R. O. (2014). Association of Mediterranean Diet with Mild Cognitive

Impairment and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Alzheimer's Disease*, *39*(2), 271-282. https://doi.org/10.3233/JAD-130830

Singh, R. P., Halaka, D. A., Hayouka, Z., & Tirosh, O. (2020). High-Fat Diet Induced Alteration of Mice Microbiota and the Functional Ability to Utilize Fructooligosaccharide for Ethanol Production. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00376

Siragusa, S., Angelis, M. D., Cagno, R. D., Rizzello, C. G., Coda, R., & Gobbetti, M. (2007). Synthesis of γ-Aminobutyric Acid by Lactic Acid Bacteria Isolated from a Variety of Italian Cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(22), 7283-7290. https://doi.org/10.1128/AEM.01064-07

Sircana, A., Framarin, L., Leone, N., Berrutti, M., Castellino, F., Parente, R., De Michieli, F., Paschetta, E., & Musso, G. (2018). Altered Gut Microbiota in Type 2 Diabetes: Just a Coincidence? *Current Diabetes Reports*, *18*(10), 98. https://doi.org/10.1007/s11892-018-1057-6

Slooter, A. J., Cruts, M., Kalmijn, S., Hofman, A., Breteler, M. M., Van Broeckhoven, C., & van Duijn, C. M. (1998). Risk estimates of dementia by apolipoprotein E genotypes from a population-based incidence study: The Rotterdam Study. *Archives of Neurology*, *55*(7), 964-968. https://doi.org/10.1001/archneur.55.7.964

Smith, C. J., Emge, J. R., Berzins, K., Lung, L., Khamishon, R., Shah, P., Rodrigues, D. M., Sousa, A. J., Reardon, C., Sherman, P. M., Barrett, K. E., & Gareau, M. G. (2014). Probiotics normalize the gut-brain-microbiota axis in immunodeficient mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *307*(8), G793-G802. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00238.2014

Smith, Q. R., & Nagura, H. (2001). Fatty acid uptake and incorporation in brain: Studies with the perfusion model. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, *16*(2-3), 167-172; discussion 215-221. https://doi.org/10.1385/JMN:16:2-3:167

Smyth, E. M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y., & FitzGerald, G. A. (2009). Prostanoids in health and disease. *Journal of Lipid Research*, *50 Suppl*, S423-428. https://doi.org/10.1194/jlr.R800094-JLR200

Sobhanifar, S., Schneider, B., Löhr, F., Gottstein, D., Ikeya, T., Mlynarczyk, K., Pulawski, W., Ghoshdastider, U., Kolinski, M., Filipek, S., Güntert, P., Bernhard, F., & Dötsch, V. (2010). Structural investigation of the C-terminal catalytic fragment of presenilin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(21), 9644-9649. https://doi.org/10.1073/pnas.1000778107

Sochocka, M., Donskow-Łysoniewska, K., Diniz, B. S., Kurpas, D., Brzozowska, E., & Leszek, J. (2019). The Gut Microbiome Alterations and Inflammation-Driven Pathogenesis of Alzheimer's Disease-a Critical Review. *Molecular Neurobiology*, *56*(3), 1841-1851. https://doi.org/10.1007/s12035-018-1188-4

Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 7-35. https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8

Soldano, A., & Hassan, B. A. (2014). Beyond pathology: APP, brain development and Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 7.

Solfrizzi, V., Frisardi, V., Seripa, D., Logroscino, G., Imbimbo, B. P., D'Onofrio, G., Addante, F., Sancarlo, D., Cascavilla, L., Pilotto, A., & Panza, F. (2011). Mediterranean diet in predementia and dementia syndromes. *Current Alzheimer Research*, *8*(5), 520-542. https://doi.org/10.2174/156720511796391809

Solfrizzi, V., & Panza, F. (2014). Mediterranean Diet and Cognitive Decline. A Lesson from the Whole-Diet Approach: What Challenges Lie Ahead? *Journal of Alzheimer's Disease*, *39*(2), 283-286. https://doi.org/10.3233/JAD-130831

Soupene, E., & Kuypers, F. A. (2008). Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *233*(5), 507-521. https://doi.org/10.3181/0710-MR-287

Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Bennett, D. A., Craft, S., Fagan, A. M., Iwatsubo, T., Jack, C. R., Kaye, J., Montine, T. J., Park, D. C., Reiman, E. M., Rowe, C. C., Siemers, E., Stern, Y., Yaffe, K., Carrillo, M. C., Thies, B., Morrison-Bogorad, M., … Phelps, C. H. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, *7*(3), 280-292. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.003

Stables, M. J., & Gilroy, D. W. (2011). Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Progress in Lipid Research*, *50*(1), 35-51. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.07.005

Stahel, P., Kim, J. J., Xiao, C., & Cant, J. P. (2017). Of the milk sugars, galactose, but not prebiotic galacto-oligosaccharide, improves insulin sensitivity in male Sprague-Dawley rats. *PloS One*, *12*(2), e0172260. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172260

Stakos, D. A., Stamatelopoulos, K., Bampatsias, D., Sachse, M., Zormpas, E., Vlachogiannis, N. I., Tual-Chalot, S., & Stellos, K. (2020). The Alzheimer's Disease Amyloid-Beta Hypothesis in Cardiovascular Aging and Disease: JACC Focus Seminar. *Journal of the American College of Cardiology*, *75*(8), 952-967. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.12.033

Stevens, B. R., Goel, R., Seungbum, K., Richards, E. M., Holbert, R. C., Pepine, C. J., & Raizada, M. K. (2018). Increased human intestinal barrier permeability plasma biomarkers zonulin and FABP2 correlated with plasma LPS and altered gut microbiome in anxiety or depression. *Gut*, *67*(8), 1555-1557. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314759

Storandt, M., Botwinick, J., Danziger, W. L., Berg, L., & Hughes, C. P. (1984). Psychometric Differentiation of Mild Senile Dementia of the Alzheimer Type. *Archives of Neurology*, *41*(5), 497-499. https://doi.org/10.1001/archneur.1984.04050170043013

Storck, S. E., Meister, S., Nahrath, J., Meißner, J. N., Schubert, N., Di Spiezio, A., Baches, S., Vandenbroucke, R. E., Bouter, Y., Prikulis, I., Korth, C., Weggen, S., Heimann, A., Schwaninger, M., Bayer, T. A., & Pietrzik, C. U. (2016). Endothelial LRP1 transports amyloid-β (1-42) across the blood-brain barrier. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(1), 123-136. https://doi.org/10.1172/JCI81108

Strasser, B., Becker, K., Fuchs, D., & Gostner, J. M. (2017). Kynurenine pathway metabolism and immune activation: Peripheral measurements in psychiatric and co-morbid conditions. *Neuropharmacology*, *112*, 286-296. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.02.030

Strozyk, D., Launer, L. J., Adlard, P. A., Cherny, R. A., Tsatsanis, A., Volitakis, I., Blennow, K., Petrovitch, H., White, L. R., & Bush, A. I. (2009). Zinc and copper modulate Alzheimer Abeta levels in human cerebrospinal fluid. *Neurobiology of Aging*, *30*(7), 1069-1077. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.10.012

Su, D., Li, W., She, X., Chen, X., Zhai, Q., Cui, B., & Wang, R. (2018). Chronic noise exposure exacerbates AD-like neuropathology in SAMP8 mice in relation to Wnt signaling in the PFC and hippocampus. *Scientific Reports*, *8*(1), 14622. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32948-4

Su, X., Yan, H., Huang, Y., Yun, H., Zeng, B., Wang, E., Liu, Y., Zhang, Y., Liu, F., Che, Y., Zhang, Z., & Yang, R. (2015a). Expression of FABP4, adipsin and adiponectin in

Paneth cells is modulated by gut Lactobacillus. *Scientific Reports*, *5*(1), 18588. https://doi.org/10.1038/srep18588

Südhof, T. C. (2013). Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, *80*(3), 675-690. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.022

Suez, J., Zmora, N., Segal, E., & Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature Medicine*, *25*(5), 716-729. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x

Sumagin, R., Brazil, J. C., Nava, P., Nishio, H., Alam, A., Luissint, A. C., Weber, D. A., Neish, A. S., Nusrat, A., & Parkos, C. A. (2016). Neutrophil interactions with epithelial-expressed ICAM-1 enhances intestinal mucosal wound healing. *Mucosal Immunology*, *9*(5), 1151-1162. https://doi.org/10.1038/mi.2015.135

Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., & Rao, Z. (2005). Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. *Cell*, *121*(7), 1043-1057. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.025

Sun, G. Y., Shelat, P. B., Jensen, M. B., He, Y., Sun, A. Y., & Simonyi, A. (2010). Phospholipases A2 and inflammatory responses in the central nervous system. *Neuromolecular Medicine*, *12*(2), 133-148. https://doi.org/10.1007/s12017-009-8092-z

Sun, J., Xu, J., Ling, Y., Wang, F., Gong, T., Yang, C., Ye, S., Ye, K., Wei, D., Song, Z., Chen, D., & Liu, J. (2019). Fecal microbiota transplantation alleviated Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP/PS1 transgenic mice. *Translational Psychiatry*, *9*(1), 189. https://doi.org/10.1038/s41398-019-0525-3

Szczepanik, A. M., Funes, S., Petko, W., & Ringheim, G. E. (2001). IL-4, IL-10 and IL-13 modulate Ab (1–42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *Journal of Neuroimmunology*, 14.

Taber, L., Chiu, C.-H., & Whelan, J. (1998). Assessment of the arachidonic acid content in foods commonly consumed in the American diet. *Lipids*, *33*(12), 1151-1157. https://doi.org/10.1007/s11745-998-0317-4

Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., & Kishimoto, T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*, *58*(3), 573-581. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90438-8

Taki, Y., Kinomura, S., Sato, K., Inoue, K., Goto, R., Okada, K., Uchida, S., Kawashima, R., & Fukuda, H. (2008). Relationship Between Body Mass Index and Gray Matter Volume in 1,428 Healthy Individuals. *Obesity*, *16*(1), 119-124. https://doi.org/10.1038/oby.2007.4

Tallima, H., & El Ridi, R. (2017). Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. *Journal of Advanced Research*, *11*, 33-41. https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.11.004

Tamura, A., Hayashi, H., Imasato, M., Yamazaki, Y., Hagiwara, A., Wada, M., Noda, T., Watanabe, M., Suzuki, Y., & Tsukita, S. (2011). Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na+ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology*, *140*(3), 913-923. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.08.006

Tang, J. X., Baranov, D., Hammond, M., Shaw, L. M., Eckenhoff, M. F., & Eckenhoff, R. G. (2011). Human Alzheimer and inflammation biomarkers after anesthesia and surgery. *Anesthesiology*, *115*(4), 727-732. https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31822e9306

Tanzi, R. E. (2012). The Genetics of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(10), a006296. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006296

Tawiah, A., Moreau, F., Kumar, M., Tiwari, S., Falguera, J., & Chadee, K. (2018). High MUC2 Mucin Biosynthesis in Goblet Cells Impedes Restitution and Wound Healing by Elevating Endoplasmic Reticulum Stress and Altered Production of Growth Factors.

The American Journal of Pathology, *188*(9), 2025-2041. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.05.013

Teixeira, L. G., Leonel, A. J., Aguilar, E. C., Batista, N. V., Alves, A. C., Coimbra, C. C., Ferreira, A. V., de Faria, A. M. C., Cara, D. C., & Alvarez Leite, J. I. (2011). The combination of high-fat diet-induced obesity and chronic ulcerative colitis reciprocally exacerbates adipose tissue and colon inflammation. *Lipids in Health and Disease*, *10*(1), 204. https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-204

Thaiss, C. A., Zmora, N., Levy, M., & Elinav, E. (2016). The microbiome and innate immunity. *Nature*, *535*(7610), 65-74. https://doi.org/10.1038/nature18847

Thangaraju, M., Cresci, G. A., Liu, K., Ananth, S., Gnanaprakasam, J. P., Browning, D. D., Mellinger, J. D., Smith, S. B., Digby, G. J., Lambert, N. A., Prasad, P. D., & Ganapathy, V. (2009). GPR109A Is a G-protein–Coupled Receptor for the Bacterial Fermentation Product Butyrate and Functions as a Tumor Suppressor in Colon. *Cancer Research*, *69*(7), 2826-2832. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4466

Thomas, C. M., Hong, T., Pijkeren, J. P. van, Hemarajata, P., Trinh, D. V., Hu, W., Britton, R. A., Kalkum, M., & Versalovic, J. (2012). Histamine Derived from Probiotic Lactobacillus reuteri Suppresses TNF via Modulation of PKA and ERK Signaling. *PLOS ONE*, *7*(2), e31951. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031951

Thomas, M. H., Paris, C., Magnien, M., Colin, J., Pelleïeux, S., Coste, F., Escanyé, M.-C., Pillot, T., & Olivier, J.-L. (2017). Dietary arachidonic acid increases deleterious effects of amyloid-β oligomers on learning abilities and expression of AMPA receptors: Putative role of the ACSL4-cPLA2 balance. *Alzheimer's Research & Therapy*, *9*. https://doi.org/10.1186/s13195-017-0295-1

Thomas, M. H., Pelleieux, S., Vitale, N., & Olivier, J. L. (2016). Dietary arachidonic acid as a risk factor for age-associated neurodegenerative diseases: Potential mechanisms. *Biochimie*, *130*, 168-177. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.07.013

Thomas, M., Wrzosek, L., Ben-Yahia, L., Noordine, M.-L., Gitton, C., Chevret, D., Langella, P., Mayeur, C., Cherbuy, C., & Rul, F. (2011). Carbohydrate Metabolism Is Essential for the Colonization of Streptococcus thermophilus in the Digestive Tract of Gnotobiotic Rats. *PLoS ONE*, *6*(12), e28789. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028789

Toonen, R. F. G., de Vries, K. J., Zalm, R., Südhof, T. C., & Verhage, M. (2005). Munc18-1 stabilizes syntaxin 1 but is not essential for syntaxin 1 targeting and SNARE complex formation. *Journal of Neurochemistry*, *93*(6), 1393-1400. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03128.x

Trautwein, C., Rakemann, T., Niehof, M., Rose-John, S., & Manns, M. P. (1996). Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration. *Gastroenterology*, *110*(6), 1854-1862. https://doi.org/10.1053/gast.1996.v110.pm8964411

Tsaluchidu, S., Cocchi, M., Tonello, L., & Puri, B. K. (2008). Fatty acids and oxidative stress in psychiatric disorders. *BMC Psychiatry*, *8 Suppl 1*, S5. https://doi.org/10.1186/1471-244X-8-S1-S5

Tsavkelova, E. A., Botvinko, I. V., Kudrin, V. S., & Oleskin, A. V. (2000). Detection of neurotransmitter amines in microorganisms with the use of high-performance liquid chromatography. *Doklady Biochemistry: Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biochemistry Section*, *372*(1-6), 115-117.

Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, *552*(Pt 2), 335-344. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478

Vainer, B., Horn, T., & Nielsen, O. H. (2006). Colonic epithelial cell expression of ICAM-1 relates to loss of surface continuity: A comparative study of inflammatory bowel disease

and colonic neoplasms. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *41*(3), 318-325. https://doi.org/10.1080/00365520510024241

Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, *12*(10), 1161-1208. https://doi.org/10.2174/0929867053764635

Val-Laillet, D., Guérin, S., Coquery, N., Nogret, I., Formal, M., Romé, V., Normand, L. L., Meurice, P., Randuineau, G., Guilloteau, P., Malbert, C.-H., Parnet, P., Lallès, J.-P., & Segain, J.-P. (2018). Oral sodium butyrate impacts brain metabolism and hippocampal neurogenesis, with limited effects on gut anatomy and function in pigs. *The FASEB Journal*, *32*(4), 2160-2171. https://doi.org/10.1096/fj.201700547RR

van der Heijden, R. A., Sheedfar, F., Morrison, M. C., Hommelberg, P. P., Kor, D., Kloosterhuis, N. J., Gruben, N., Youssef, S. A., de Bruin, A., Hofker, M. H., Kleemann, R., Koonen, D. P., & Heeringa, P. (2015). High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging (Albany NY)*, *7*(4), 256-267.

Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology*, *68*, 403-429. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.131404

van Bokhorst-van de Veen, H., van Swam, I., Wels, M., Bron, P. A., & Kleerebezem, M. (2012). Congruent Strain Specific Intestinal Persistence of Lactobacillus plantarum in an Intestine-Mimicking In Vitro System and in Human Volunteers. *PLoS ONE*, *7*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044588

Vasquez, N., Suau, A., Magne, F., Pochart, P., & Pélissier, M.-A. (2009). Differential Effects of Bifidobacterium pseudolongum Strain Patronus and Metronidazole in the Rat Gut. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(2), 381-386. https://doi.org/10.1128/AEM.01731-08

Vassar, R. (2004). BACE1: The beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, *23*(1-2), 105-114. https://doi.org/10.1385/JMN:23:1-2:105

Venkatesh, M., Mukherjee, S., Wang, H., Li, H., Sun, K., Benechet, A. P., Qiu, Z., Maher, L., Redinbo, M. R., Phillips, R. S., Fleet, J. C., Kortagere, S., Mukherjee, P., Fasano, A., Le Ven, J., Nicholson, J. K., Dumas, M. E., Khanna, K. M., & Mani, S. (2014). Symbiotic Bacterial Metabolites Regulate Gastrointestinal Barrier Function via the Xenobiotic Sensor PXR and Toll-like Receptor 4. *Immunity*, *41*(2), 296-310. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.014

Vesa, T., Pochart, P., & Marteau, P. (2000). Pharmacokinetics of Lactobacillus plantarum NCIMB 8826, Lactobacillus fermentum KLD, and Lactococcus lactis MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *14*(6), 823-828. https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2000.00763.x

Vicari, A. P., Ait-Yahia, S., Chemin, K., Mueller, A., Zlotnik, A., & Caux, C. (2000). Antitumor Effects of the Mouse Chemokine 6Ckine/SLC Through Angiostatic and Immunological Mechanisms. *The Journal of Immunology*, *165*(4), 1992-2000. https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.4.1992

Viladomiu, M., Hontecillas, R., & Bassaganya-Riera, J. (2016). Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. *European Journal of Pharmacology*, *785*, 87-95. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.095

Villumsen, M., Aznar, S., Pakkenberg, B., Jess, T., & Brudek, T. (2019). Inflammatory bowel disease increases the risk of Parkinson's disease: A Danish nationwide cohort study 1977–2014. *Gut*, *68*(1), 18-24. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315666

Viñuela, F., & Barro, A. (2021). Assessment of a Potential Synergistic Effect of Souvenaid ® in Mild Alzheimer's Disease Patients on Treatment with Acetylcholinesterase

Inhibitors: An Observational, Non-Interventional Study. *Journal of Alzheimer's Disease*, *80*(4), 1377-1382. https://doi.org/10.3233/JAD-201357

Vogt, N. M., Kerby, R. L., Dill-McFarland, K. A., Harding, S. J., Merluzzi, A. P., Johnson, S. C., Carlsson, C. M., Asthana, S., Zetterberg, H., Blennow, K., Bendlin, B. B., & Rey, F. E. (2017). Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, *7*(1), 13537. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13601-y

von Bernhardi, R., & Eugenín, J. (2004). Microglial reactivity to beta-amyloid is modulated by astrocytes and proinflammatory factors. Brain Research, 1025(1-2), 186-193. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.07.084

Walsham, N. E., & Sherwood, R. A. (2016). Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, *9*, 21-29. https://doi.org/10.2147/CEG.S51902

Wang, C., Klechikov, A. G., Gharibyan, A. L., Wärmländer, S. K. T. S., Jarvet, J., Zhao, L., Jia, X., Narayana, V. K., Shankar, S. K., Olofsson, A., Brännström, T., Mu, Y., Gräslund, A., & Morozova-Roche, L. A. (2014). The role of pro-inflammatory S100A9 in Alzheimer's disease amyloid-neuroinflammatory cascade. *Acta Neuropathologica*, *127*(4), 507-522. https://doi.org/10.1007/s00401-013-1208-4

Wang, H., Hitron, I. M., Iadecola, C., & Pickel, V. M. (2005). Synaptic and vascular associations of neurons containing cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase in rat somatosensory cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *15*(8), 1250-1260. https://doi.org/10.1093/cercor/bhi008

Wang, J.-H., Wu, Y.-J., Tee, B. L., & Lo, R. Y. (2018). Medical Comorbidity in Alzheimer's Disease: A Nested Case-Control Study. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *63*(2), 773-781. https://doi.org/10.3233/JAD-170786

Wang, Y., Wang, Z., Wang, Y., Li, F., Jia, J., Song, X., Qin, S., Wang, R., Jin, F., Kitazato, K., & Wang, Y. (2018). The Gut-Microglia Connection: Implications for Central Nervous System Diseases. *Frontiers in Immunology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02325

Weidinger, C., Ziegler, J. F., Letizia, M., Schmidt, F., & Siegmund, B. (2018). Adipokines and Their Role in Intestinal Inflammation. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1974. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01974

Wesson, D. W., Borkowski, A. H., Landreth, G. E., Nixon, R. A., Levy, E., & Wilson, D. A. (2011). Sensory Network Dysfunction, Behavioral Impairments, and Their Reversibility in an Alzheimer's β-Amyloidosis Mouse Model. *The Journal of Neuroscience*, *31*(44), 15962-15971. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2085-11.2011

Westfall, S., Lomis, N., Kahouli, I., Dia, S. Y., Singh, S. P., & Prakash, S. (2017). Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: Deciphering the gut brain axis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *74*(20), 3769-3787. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2550-9

Whitmer, R. A., Sidney, S., Selby, J., Johnston, S. C., & Yaffe, K. (2005). Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology*, *64*(2), 277-281. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000149519.47454.F2

WHO. (2020). *Principaux repères sur l'obésité et le surpoids*. https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight

Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C., & Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(10), 3698-3703. https://doi.org/10.1073/pnas.0812874106

Williams, J. H. (1996). Retrograde messengers and long-term potentiation: A progress report. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling*, *14*(1-3), 331-339. https://doi.org/10.1016/0929-7855(96)00542-1

Wlodarska, M., Thaiss, C. A., Nowarski, R., Henao-Mejia, J., Zhang, J.-P., Brown, E. M., Frankel, G., Levy, M., Katz, M. N., Philbrick, W. M., Elinav, E., Finlay, B. B., & Flavell, R. A. (2014). NLRP6 Inflammasome Orchestrates the Colonic Host-Microbial Interface by Regulating Goblet Cell Mucus Secretion. *Cell*, *156*(5), 1045-1059. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.026

Woo, J.-Y., Gu, W., Kim, K.-A., Jang, S.-E., Han, M. J., & Kim, D.-H. (2014). Lactobacillus pentosus var. Plantarum C29 ameliorates memory impairment and inflammaging in a d-galactose-induced accelerated aging mouse model. *Anaerobe*, *27*, 22-26. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.03.003

Woodling, N. S., Wang, Q., Priyam, P. G., Larkin, P., Shi, J., Johansson, J. U., Zagol-Ikapitte, I., Boutaud, O., & Andreasson, K. I. (2014). Suppression of Alzheimer-associated inflammation by microglial prostaglandin-E2 EP4 receptor signaling. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *34*(17), 5882-5894. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0410-14.2014

Wu, J.-T., Chiang, Y.-R., Huang, W.-Y., & Jane, W.-N. (2006). Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *80*(4), 338-345. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.09.011

Wu, S., Yi, J., Zhang, Y.-G., Zhou, J., & Sun, J. (2015). Leaky intestine and impaired microbiome in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiological Reports*, *3*(4). https://doi.org/10.14814/phy2.12356

Wu, W., Nicolazzo, J. A., Wen, L., Chung, R., Stankovic, R., Bao, S. S., Lim, C. K., Brew, B. J., Cullen, K. M., & Guillemin, G. J. (2013). Expression of tryptophan 2,3-dioxygenase and production of kynurenine pathway metabolites in triple transgenic mice and human Alzheimer's disease brain. *PloS One*, *8*(4), e59749. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059749

Xiao, G., & Gan, L.-S. (2013). Receptor-mediated endocytosis and brain delivery of therapeutic biologics. *International Journal of Cell Biology*, *2013*, 703545. https://doi.org/10.1155/2013/703545

Yamashita, A., Hayashi, Y., Nemoto-Sasaki, Y., Ito, M., Oka, S., Tanikawa, T., Waku, K., & Sugiura, T. (2014). Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Progress in Lipid Research*, *53*, 18-81. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.10.001

Yang, H., Qu, Z., Zhang, J., Huo, L., Gao, J., & Gao, W. (2016). Ferulic acid ameliorates memory impairment in d-galactose-induced aging mouse model. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *67*(7), 806-817. https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1198890

Yang, J., Elbaz-Younes, I., Primo, C., Murungi, D., & Hirschi, K. D. (2018). Intestinal permeability, digestive stability and oral bioavailability of dietary small RNAs. *Scientific Reports*, *8*(1), 10253. https://doi.org/10.1038/s41598-018-28207-1

Yang, Q., Liang, Q., Balakrishnan, B., Belobrajdic, D. P., Feng, Q.-J., & Zhang, W. (2020). Role of Dietary Nutrients in the Modulation of Gut Microbiota: A Narrative Review. *Nutrients*, *12*(2). https://doi.org/10.3390/nu12020381

Yang, Y., Wang, H., Kouadir, M., Song, H., & Shi, F. (2019). Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death & Disease*, *10*(2), 128. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1413-8

Yano, J. M., Yu, K., Donaldson, G. P., Shastri, G. G., Ann, P., Ma, L., Nagler, C. R., Ismagilov, R. F., Mazmanian, S. K., & Hsiao, E. Y. (2015). Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell*, *161*(2), 264-276. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047

Yoshioka, H., Takeda, T., Higuchi, K., Ohshio, G., Miyake, T., Sugiyama, T., & Kita, T. (1990). Immunohistochemical Examination of Peyer's Patches in Senescence-Accelerated Mice. *Autoimmunity*, *8*(1), 25-35. https://doi.org/10.3109/08916939008998429

Yu, Y., Bai, F., Wang, W., Liu, Y., Yuan, Q., Qu, S., Zhang, T., Tian, G., Li, S., Li, D., & Ren, G. (2015). Fibroblast growth factor 21 protects mouse brain against D-galactose induced aging via suppression of oxidative stress response and advanced glycation end products formation. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *133*, 122-131. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.03.020

Yuzwa, S. A., Shan, X., Jones, B. A., Zhao, G., Woodward, M. L., Li, X., Zhu, Y., McEachern, E. J., Silverman, M. A., Watson, N. V., Gong, C.-X., & Vocadlo, D. J. (2014). Pharmacological inhibition of O-GlcNAcase (OGA) prevents cognitive decline and amyloid plaque formation in bigenic tau/APP mutant mice. *Molecular Neurodegeneration*, *9*, 42. https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-42

Zarini, S., Hankin, J. A., Murphy, R. C., & Gijón, M. A. (2014). Lysophospholipid acyltransferases and eicosanoid biosynthesis in zebrafish myeloid cells. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, *113-115*, 52-61. https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2014.08.003

Zhan, X., Stamova, B., Jin, L.-W., DeCarli, C., Phinney, B., & Sharp, F. R. (2016). Gram-negative bacterial molecules associate with Alzheimer disease pathology. *Neurology*, *87*(22), 2324-2332. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003391

Zhang, D., Han, J., Li, Y., Yuan, B., Zhou, J., Cheong, L., Li, Y., Lu, C., & Su, X. (2018). Tuna Oil Alleviates D -Galactose Induced Aging in Mice Accompanied by Modulating Gut Microbiota and Brain Protein Expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(22), 5510-5520. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00446

Zhang, H., Wang, Z., Li, Y., Han, J., Cui, C., Lu, C., Zhou, J., Cheong, L., Li, Y., Sun, T., Zhang, D., & Su, X. (2018). Sex-Based Differences in Gut Microbiota Composition in Response to Tuna Oil and Algae Oil Supplementation in a D-galactose-Induced Aging Mouse Model. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *10*. https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00187

Zhang, S. S., Xu, Z. S., Qin, L. H., & Kong, J. (2020). Low-sugar yogurt making by the co-cultivation of Lactobacillus plantarum WCFS1 with yogurt starter cultures. *Journal of Dairy Science*, *103*(4), 3045-3054. https://doi.org/10.3168/jds.2019-17347

Zhang, Z., & Li, D. (2018). Thermal processing of food reduces gut microbiota diversity of the host and triggers adaptation of the microbiota: Evidence from two vertebrates. *Microbiome*, *6*(1), 99. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0471-y

Zhao, J., Tian, F., Yan, S., Zhai, Q., Zhang, H., & Chen, W. (2018). Lactobacillus plantarum CCFM10 alleviating oxidative stress and restoring the gut microbiota in D-galactose-induced aging mice. *Food & Function*, *9*(2), 917-924. https://doi.org/10.1039/C7FO01574G

Zhao, Y., Cong, L., Jaber, V., & Lukiw, W. J. (2017a). Microbiome-Derived Lipopolysaccharide Enriched in the Perinuclear Region of Alzheimer's Disease Brain. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1064. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01064

Zhao, Y., Jaber, V., & Lukiw, W. J. (2017b). Secretory Products of the Human GI Tract Microbiome and Their Potential Impact on Alzheimer's Disease (AD): Detection of

Lipopolysaccharide (LPS) in AD Hippocampus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, 318. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00318

Zhao, Y., & Lukiw, W. J. (2015). Microbiome-generated amyloid and potential impact on amyloidogenesis in Alzheimer's disease (AD). *Journal of nature and science*, *1*(7). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4469284/

Zhuang, P., Shou, Q., Lu, Y., Wang, G., Qiu, J., Wang, J., He, L., Chen, J., Jiao, J., & Zhang, Y. (2017). Arachidonic acid sex-dependently affects obesity through linking gut microbiota-driven inflammation to hypothalamus-adipose-liver axis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1863(11), 2715-2726. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.07.003

Zhu, J., Mu, X., Zeng, J., Xu, C., Liu, J., Zhang, M., Li, C., Chen, J., Li, T., & Wang, Y. (2014). Ginsenoside Rg1 Prevents Cognitive Impairment and Hippocampus Senescence in a Rat Model of D-Galactose-Induced Aging. *PLOS ONE*, *9*(6), e101291. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101291

Zhu, X., Han, Y., Du, J., Liu, R., Jin, K., & Yi, W. (2017). Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system. *Oncotarget*, *8*(32), 53829-53838. https://doi.org/10.18632/oncotarget.17754

Zinöcker, M. K., & Lindseth, I. A. (2018). The Western Diet–Microbiome-Host Interaction and Its Role in Metabolic Disease. *Nutrients*, *10*(3), 365. https://doi.org/10.3390/nu10030365

Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, *57*(2), 178-201. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003

Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*, *12*(12), 723-738. https://doi.org/10.1038/nrn3114

Zlokovic, B. V., Deane, R., Sagare, A. P., Bell, R. D., & Winkler, E. A. (2010). Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: A serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid β-peptide elimination from the brain. *Journal of Neurochemistry*, *115*(5), 1077-1089. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07002.x

Zmora, N., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Mor, U., Dori-Bachash, M., Bashiardes, S., Kotler, E., Zur, M., Regev-Lehavi, D., Brik, R. B.-Z., Federici, S., Cohen, Y., Linevsky, R., Rothschild, D., Moor, A. E., Ben-Moshe, S., Harmelin, A., Itzkovitz, S., Maharshak, N., … Elinav, E. (2018). Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. *Cell*, *174*(6), 1388-1405.e21. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.041

Communications scientifiques

Articles scientifiques

- **"Brain immune cells characterization in UCMS exposed P2X7 knock-out mouse."**

Troubat R, Leman S, **Pinchaud K**, Surget A, Barone P, Roger S, Le Guisquet AM, Brizard B, Belzung C, Camus V. 2021. Brain Behav Immun, 94:159-174.
Impact factor: 6.633

- **"Dietary arachidonic acid: a Janus face actor in brain and Alzheimer's disease?"**

Pinchaud K, Maguin-Gaté K, Olivier J-L. Oilseeds and fats, Crops and Lipids,25(4), D406
Impact factor : 1.89

Communications par affiche

- **Poster scientifique**

« Dietary arachidonic acid induces alterations in gut microbiota and expression of astrocytic marker GFAP in male Balb/C mice »
Tours (43ème colloque de la société de Neuroendocrinologie) / Octobre 2019
Vandoeuvre-Lès-Nancy (2nde édition Journée de la recherche Master Sciences du Vivant) / Janvier 2020

- **Poster de vulgarisation scientifique**

« Les produits laitiers comme moyen de prévention de la Maladie d'Alzheimer ? »
Saint-Dié-Des-Vosges (DocLor) / mai 2019
Poster classé deuxième sur soixante-seize participants

Katleen Pinchaud

Impact of dietary arachidonic acid intake on the gut microbiota and the gut-brain axis.

Consequences for prevention of Alzheimer's disease by probiotics.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease associated with aging, consisting of a major public health problem worldwide. There is currently no effective treatment or established preventions for this disease, highlighting the importance of the design of preventive strategies in the fight against this disease. Western diets are particularly rich in ω-6 fatty acids, especially arachidonic acid (ARA), which are converted into many inflammation mediators in the organism. Previous laboratory results have shown that dietary intake of ARA sensitizes mice to the neurotoxicity of Aβ peptide oligomers, the main agent of AD. In this thesis work, we studied the impact of this dietary intake of ARA on the fecal microbiota and the microbiota-gut-brain axis. For 9 to 12 weeks, three groups of 15 mice have consumed one of these 3 diets : a conventional murine diet ("Sdt-ARA" of 5% lipids), a moderately high-fat diet of 15% lipids including 31.9% of linoleic acid ("HL-ARA"), and a diet of 15% lipids including 25.3% linoleic acid and 6.6% ARA ("HL+ARA").

Analysis of the fecal microbiota revealed that the "HL-ARA" diet promotes proliferation of the *Bifidobacterium pseudolongum* strain, which has been show to possess anti-inflammatory activities. Furthermore, the supply of ARA suppresses this proliferation by favouring *Escherichia-Shigella* multiplication (with potentiating effects on inflammation). A 3-to-11-fold increase in mRNA levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1β and TNFα has been observed in the colon of mice fed with the "HL+ARA" diet. Enrichment of ARA led to an increase of the expression of other mediators of colon inflammation such as CD40, adiponectin, and ICAM-1, as well as the claudin 1 and occludin markers which are components of cellular tight junctions. Therefore, these changes in expression suggest that the integrity of the intestinal barrier has been compromised. Moreover, dietary intake of ARA led to a 10 fold increase in TNFα mRNA levels in mesenteric adipose tissue, while the impact on the liver was found to be much more moderate. At the cerebral level, a 9 weeks food intake of ARA led to a 1.5-1.8-fold increase in the protein level of GFAP in the hippocampus and the cortex, while no changes of the microglial marker Iba1 has not been reported. We also found decreased levels of IL-6 and TNFα mRNA in the global brain tissue.

These results indicate that dietary intake of ARA induces low-grade systemic inflammation which may promote the expansion of an Alzheimer's-like process in the brain if an inducing signal occurs. As such, we also evaluated the impact of an innovative oral administration model of D-galactose, which has been described as an aging accelerator compound , leading to impairment of cognitive capacities, and the appearance of amyloid plaques in the mouse brains through elevated oxidative stress. We also studied the survival in the digestive tract of two strains of *Streptococcus thermophilus* with anti-inflammatory activity *in vitro* as reported by previous laboratory work, and of a strain of *Lactobacillus plantarum* capable of metabolizing ω-6 polyunsaturated fatty acids in conjugated fatty acids. This thesis work aims to assess the ability of these probiotic strains to fight against low-grade inflammation induced by dietary intake of ARAs and oxidative stress induced by D-galactose. New work is underway in the laboratory to investigate in more details all the biological processes at work in the different models and to determine the impact of probiotics on a combined administration of D-galactose and an ARA-enriched diet.

Katleen Pinchaud

Impact d'un apport alimentaire en acide arachidonique sur le microbiote intestinal et l'axe intestin-cerveau. Conséquences pour une prévention de la maladie d'Alzheimer par les probiotiques.

Résumé français

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative associée au vieillissement, constituant un problème de santé publique majeure dans le monde. Il n'y a actuellement aucun traitement efficace ni de moyen reconnu de prévention de cette maladie. La conception de stratégies préventives est donc indispensable pour lutter contre ces maladies. L'alimentation occidentale est particulièrement riche en acides gras ω-6, notamment en acide arachidonique (ARA), converti en nombreux médiateurs de l'inflammation dans le corps. Des travaux antérieurs du laboratoire ont montré qu'un apport alimentaire en ARA sensibilise les souris à la neurotoxicité des oligomères de peptides Aβ, principal agent de la MA. Dans ce travail de thèse, nous avons étudié l'incidence de cet apport alimentaire en ARA sur le microbiote fécal et l'axe microbiote-intestin-cerveau. Nous avons soumis pendant 9 à 12 semaines des cohortes de 15 souris à 3 régimes alimentaires, un régime conventionnel murin (« Sdt-ARA » de 5% de lipides), un régime modérément hyperlipidique de 15 % de lipides dont 31,9% d'acide linoléique (« HL-ARA ») et un régime de 15% de lipides dont 25,3% d'acide linoléique et 6,6% d'ARA (« HL+ARA »).

L'analyse du microbiote fécal a révélé que le régime « HL-ARA » favorise la prolifération de l'espèce *Bifidobacterium pseudolongum* dont les activités bénéfiques contre l'inflammation ont été rapportées, et que l'apport d'ARA supprime cette prolifération en favorisant celle du genre *Escherichia-Shigella* aux effets potentialisateurs de l'inflammation. Les niveaux d'ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNFα ont augmenté entre 3 et 11 fois dans le colon des souris nourries avec le régime « HL+ARA ». D'autres médiateurs de l'inflammation colique comme CD40, adiponectine et ICAM-1 ont vu leur expression augmenter par l'enrichissement en ARA tout comme les marqueurs claudine 1 et occludine qui sont des constituants des jonctions serrées. Ces modifications d'expression suggèrent donc des modifications de l'intégrité de la barrière intestinale. L'apport alimentaire d'ARA a également élevé de plus de 10 fois les niveaux d'ARNm du TNFα dans le tissu adipeux mésentérique alors que le retentissement hépatique a été trouvé beaucoup plus modéré. Au niveau cérébral l'apport alimentaire en ARA entraine une augmentation de 1,5-1,8 fois des niveaux d'expression protéique de la GFAP après 9 semaines de régime dans les hippocampes et le cortex alors que ceux du marqueur microglial Iba1 n'a pas été modifié. Nous avons également mis en évidence une diminution des niveaux d'ARNm de l'IL-6 et du TNFα dans le tissu cérébral global.

Ces résultats indiquent que l'apport alimentaire en ARA induit une inflammation de bas grade systémique qui pourrait favoriser l'expansion d'un processus de type Alzheimer dans le cerveau si un signal inducteur survient. A ce titre, nous avons également évalué l'impact d'un modèle d'administration *per os* innovant de D-galactose rapporté comme étant capable d'induire un vieillissement accéléré, une altération des capacités cognitives et l'apparition de plaques amyloïdes dans le cerveau des souris en élevant le stress oxydant. Nous avons également étudié la survie dans le tube digestif de deux souches de *Streptococcus thermophilus* dont les travaux antérieurs du laboratoire ont montré l'activité anti-inflammatoire *in vitro* et d'une souche de *Lactobacillus plantarum* capable de métaboliser les acides gras polyinsaturés ω-6 en acides gras conjugués. Ce travail de thèse a pour perspective d'évaluer la capacité de ces souches probiotiques à lutter contre l'inflammation de bas grade induite par l'apport alimentaire en ARA et le stress oxydant induit par le D-galactose. De nouveaux travaux sont en cours au laboratoire afin d'investiguer plus en détail l'ensemble des processus biologiques en œuvre dans les différents modèles et de déterminer l'impact des probiotiques sur une administration conjointe de D-galactose et d'un régime riche en ARA.