

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR de médecine et de pharmacie
Cibles moléculaires et thérapeutique de la maladie d'Alzheimer - CiMoTheMA (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Sciences Biologiques et Santé (Limoges)
Secteur de recherche : Neurosciences

Présentée par :
Aline Freyssin

Comparaison des effets de la viniférine et du resvératrol dans des modèles expérimentaux de la maladie d'Alzheimer

Directeur(s) de Thèse :
Bernard Fauconneau, Agnès Rioux-Bilan

Soutenue le 02 octobre 2020 devant le jury

Jury :

Président	Sylvie Chalon	Directeur de recherche - INSERM
Rapporteur	Tangui Maurice	Directeur de recherche INSERM, Université de Montpellier
Rapporteur	Véronique Pallet	Maître de conférences, NutriNeuro, Université de Bordeaux
Membre	Bernard Fauconneau	Professeur, CIMOTHEMA, Université de Poitiers
Membre	Agnès Rioux-Bilan	Maître de conférences, CIMOTHEMA, Université de Poitiers

Pour citer cette thèse :

Aline Freyssin. *Comparaison des effets de la viniférine et du resvératrol dans des modèles expérimentaux de la maladie d'Alzheimer* [En ligne]. Thèse Neurosciences. Poitiers : Université de Poitiers, 2020. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
(Faculté Médecine et Pharmacie)
(Diplôme National – Arrêté du 25 mai 2016)
École Doctorale : Sciences Biologiques et Santé
Secteur de Recherche : Neurosciences

Présenté par :

Aline FREYSSIN

**Comparaison des effets de la viniférine et du resvératrol
dans des modèles expérimentaux de la maladie d'Alzheimer**

(Comparison of the effects of viniferin and resveratrol
in experimental models of Alzheimer's disease)

Directeur de Thèse : Professeur Bernard FAUCONNEAU

Co-directeur de Thèse : Docteur Agnès RIOUX BILAN

Soutenue le 02 octobre 2020

devant la Commission d'Examen

JURY

Dr Sylvie CHALON (HDR)	Université de Tours	Président
Dr Tangui MAURICE (HDR)	Université de Montpellier	Rapporteur
Pr Véronique PALLET	Université de Bordeaux	Rapporteur
Pr Bernard FAUCONNEAU	Université de Poitiers	Directeur de thèse
Dr Agnès RIOUX BILAN	Université de Poitiers	Co-Directeur de thèse

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
(Faculté Médecine et Pharmacie)
(Diplôme National – Arrêté du 25 mai 2016)
École Doctorale : Sciences Biologiques et Santé
Secteur de Recherche : Neurosciences

Présenté par :

Aline FREYSSIN

**Comparaison des effets de la viniférine et du resvératrol
dans des modèles expérimentaux de la maladie d'Alzheimer**

(Comparison of the effects of viniferin and resveratrol
in experimental models of Alzheimer's disease)

Directeur de Thèse : Professeur Bernard FAUCONNEAU

Co-directeur de Thèse : Docteur Agnès RIOUX BILAN

Soutenue le 02 octobre 2020

devant la Commission d'Examen

JURY

Dr Sylvie CHALON (HDR)	Université de Tours	Président
Dr Tangui MAURICE (HDR)	Université de Montpellier	Rapporteur
Pr Véronique PALLET	Université de Bordeaux	Rapporteur
Pr Bernard FAUCONNEAU	Université de Poitiers	Directeur de thèse
Dr Agnès RIOUX BILAN	Université de Poitiers	Co-Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu les membres de mon jury ayant pris le temps de juger ce travail, le Docteur Tanguy Maurice ainsi que le Professeur Véronique Pallet. J'espère que cette rencontre sera un appui et un soutien dans le début de ma toute jeune carrière professionnelle.

Je remercie le Docteur Sylvie Chalon pour avoir accepté de présider ce jury de thèse, mais surtout pour m'avoir donné l'opportunité de collaborer avec son équipe pendant ma thèse.

J'exprime ma plus profonde gratitude au Professeur Bernard Fauconneau, mon directeur de thèse. Je te suis extrêmement reconnaissante de m'avoir accordé ta confiance et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein du laboratoire. Ton calme et ta sagesse ont su canaliser mes émotions, notamment dans les derniers mois de ma thèse lorsque le temps pressait. Tes conseils scientifiques et personnels, notamment sur mon après-thèse, ont su me rassurer et m'aider à envisager au mieux la poursuite de ma carrière dans le domaine de la recherche.

Ces travaux n'auraient certainement pas pu être effectués sans l'aide précieuse du Docteur Agnès Rioux Bilan, ma co-directrice de thèse. Je te remercie énormément de m'avoir accordé ta confiance et de m'avoir laissé l'autonomie dont j'avais besoin pour mener à bien ce projet. Les discussions sur le plan scientifique mais aussi personnel m'ont énormément aidée à avancer durant ces 3 ans. Tu m'as aidée à me construire professionnellement et surtout à prendre soin de moi durant ces 3 années. Je garderai le souvenir d'une collaboration à l'écoute l'une de l'autre, toujours dans la bienveillance et la pédagogie. Merci également pour ces moments de joie et de bonne humeur partagés au laboratoire, faisant retomber la pression de la thèse.

Un grand merci également au Professeur Guylène Page, pour l'implication et le temps consacrés à mes travaux de thèse. La passion scientifique qui t'anime a su rayonner pendant ces 3 années au laboratoire et a su faire de moi une personne plus rigoureuse et plus attentive aux nouveaux résultats scientifiques. Merci également pour la confiance accordée en tant que DCACE pendant les 2 dernières années de ma thèse, qui m'ont familiarisée avec l'enseignement, une voie vers laquelle j'aimerais me diriger.

Un grand merci à toutes les personnes de l'équipe avec lesquelles nous avons partagé toujours de bons moments, eu de bonnes conversations et bien souvent rigolotes.

Merci particulièrement à Damien Chassaing, pour ta bonne humeur et tes blagues pas drôles. Ta jovialité a su amener de la gaieté pendant mes 3 années de thèse. Au-delà du laboratoire, les

discussions personnelles échangées m'ont beaucoup apporté et ont su me mettre en confiance pendant ma thèse.

Merci également aux Docteurs Véronique Ladeveze et Thierry Janet, toujours de bons conseils pendant cette thèse et surtout merci de m'avoir prise sous votre aile concernant la partie enseignement effectuée à la Faculté de Sciences Fondamentales et Appliquées.

Je remercie aussi le Vice-Doyen et les enseignants de la Faculté de Médecine et de Pharmacie qui m'ont fait confiance pendant mon contrat DCACE et ont toujours été de bon conseil. Merci au Professeurs François Seguin et Christine Imbert, aux Docteurs Vincent Thoreau, Laure Favot et Julien Buyck.

Je souhaiterais également souligner l'accueil chaleureux qui m'a été réservé à Tours dans l'unité Inserm 1253. Merci particulièrement à Sylvie Bodard pour ta bonne humeur tes conseils et la formation apportée sur les techniques de chirurgie de la souris. Merci également au docteur Sophie Sérrière pour le temps accordé à la technologie TEP-scan, chose pour laquelle je n'étais pas du tout familière.

Je remercie également le Professeur Jérôme Guillard et Flavie Perrin, de l'IC2MP UMR CNRS 7285 de Poitiers, pour le temps accordé à la purification de la viniférine et du resvératrol indispensables dans ce projet de thèse. Merci au Dr Frédéric Checler, directeur de recherche à l'institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC) à Nice pour l'envoi des cellules SH-SY5Y_{APP^{Swe}}, qui nous ont été gracieusement fournies. Merci également à Yasuro Suzuki de la société japonaise Hosoda SHC pour avoir accepté de collaborer avec le laboratoire en me fournissant la gnétine C. L'envoi de ce polyphénol gratuitement a été une aide précieuse dans ces travaux de thèse.

Il me faut aussi obligatoirement remercier les personnes avec lesquels tout a débuté concernant les neurosciences. Merci particulièrement au Docteur Guillaume Lucas avec lequel j'ai effectué mon premier stage de neurosciences et qui m'a ouvert les portes de ce domaine passionnant. Merci au Professeur Martin Parent et au Docteur Sarah Petryszyn avec lesquels j'ai effectué mon deuxième stage de neuroscience à Québec sur la maladie de Parkinson et qui ont confirmé mon envie et ma motivation de me spécialiser dans ce domaine. Merci également aux Docteurs Pierre Trifilieff, Guillaume Ferreira et Fabien Ducrocq pour l'encadrement apporté lors de mon stage de Master 1 dans le laboratoire nutri-neuro à Bordeaux et qui m'a laissé un super souvenir. Merci ensuite au Docteur Dave Gagnon avec lequel j'ai effectué mon stage de Master 2 à Québec et qui m'a laissé l'opportunité de travailler sur cerveaux humains, un souvenir très

enrichissant. Enfin un grand merci au Docteur George Mairet-Coello chercheur d'UCB Pharma, qui m'a donné la chance d'intégrer son équipe en tant qu'ingénieur juste à la sortie de mon master. Il m'a ouvert les yeux quant à mon avenir professionnel et m'a permis de me rendre compte qu'une thèse me laisserait plus d'opportunité et de liberté dans le choix de ma carrière professionnelle.

3 ans de thèse ce sont parfois des sacrifices à l'image de celui effectué par mon conjoint Baptiste qui n'a pas hésité à mettre sa carrière en pause le temps de ma thèse. Ton soutien a été sans aucun doute le plus important durant ces 3 ans. Mon pilier toujours à l'écoute, qui a toujours cru en moi, j'espère sincèrement pouvoir te rendre l'ascenseur un jour. La thèse nous aura rendus plus forts et nous aura fait comprendre l'importance de notre couple et de nos projets familiaux.

Enfin, sans l'aide précieuse de mes parents, autant psychologique que financière je ne serais certainement pas celle que je suis devenue aujourd'hui. Merci à toi Maman, pour avoir toujours cru en moi, merci pour ton soutien sans faille, ces déménagements toujours plus loin, allant même jusqu'en Belgique et surtout merci de m'avoir montré l'image d'une Maman forte et indépendante prête à se sacrifier pour les études de ses enfants. Merci à toi Papa de m'avoir laissé l'opportunité de choisir mon orientation, merci de m'avoir laissé croire en mes rêves et de m'avoir toujours soutenue lorsque toi-même tu ne comprenais pas bien quelle mouche m'avait piquée depuis si jeune à souhaiter devenir chercheuse. J'ai certes eu la chance de savoir ce que je voulais faire très jeune, mais sans votre soutien, cette petite étincelle qui m'anime ne serait pas allée bien loin. Merci également à tous les membres de ma famille pour leur soutien moral et financier qui m'ont portée durant ces 10 années supérieures. J'espère que vous verrez d'ici peu là où vous m'avez emmenée.

Enfin une thèse sans le soutien moral de mes amis aurait été très compliquée. J'ai eu la chance d'être très bien entourée durant ces 3 ans. A commencer à Poitiers avec la rencontre d'Alexia Damour et Mélanie Humeau, doctorantes du LITEC avec lesquelles j'ai noué une belle complicité en tant que doctorante. Mes fidèles copines du Master à Bordeaux, Maïena et Céline, toujours de très bon conseil et à l'écoute. Merci pour ces moments d'évasion bordelais et ces échanges sur l'angoisse de l'après thèse. Merci également à ma plus fidèle amie, celle qui a toujours cru en moi depuis ma naissance. Ma camarade de berceau, ma petite sœur avec qui j'ai tout partagé, Justine. Un soutien à la hauteur de ses convictions durant des 3 années, qui m'a toujours donné l'envie de ne jamais abandonner et de me battre lorsque ça en vaut la peine. Merci à toi Océane également, présente depuis le début de mes études supérieures et qui m'a accompagnée durant toutes mes aventures internationales. Sophie et Hervé, mes colocataires canadiens également toujours présents dans les moments importants et enfin ma team lyonnaise, Simon,

Quentin et Séverine, merci pour ces moments de partage et de convivialité partagés depuis de nombreuses années maintenant.

Enfin je te dédie ce dernier paragraphe à toi jeune padawan qui se lance dans l'aventure d'une thèse de science, tu verras que les doutes et les remises en question constantes feront partie intégrante de ton travail, mais ne te décourage pas car mettre un point final à ton aventure de thésard sera une de tes plus grandes fiertés.

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières.....	6
Liste des figures	9
Liste des tables.....	11
Liste des abréviations.....	12
Introduction	15
1 La Maladie d'Alzheimer	16
1.1 La découverte par Aloïs Alzheimer	16
1.2 Incidence et prévalence de la maladie d'Alzheimer	18
1.3 Les lésions histopathologiques	19
1.3.1 Les plaques amyloïdes.....	19
1.3.2 Les dégénérescences neurofibrillaires	24
1.3.3 La neuroinflammation	27
1.4 Les facteurs de risque.....	30
1.4.1 Les formes familiales ou génétiques	31
1.4.2 Les formes sporadiques	32
1.5 Le métabolisme de l'APP	33
1.5.1 La voie non amyloïdogène	35
1.5.2 La voie amyloïdogène	35
1.5.3 La cascade amyloïde.....	36
1.6 La clairance de l'A β	38
1.6.1 La dégradation enzymatique de l'A β	38
1.6.1 La clairance de l'A β au niveau de la BHE	38
1.7 Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer	40
1.8 Les traitements de la MA	43
1.8.1 Les inhibiteurs de l'acétylcholine estérase	43
1.8.2 Les antagonistes des récepteurs NMDA.....	44
1.8.3 Les autres traitements	45
2 Les polyphénols dans la MA	47
2.1 Les polyphénols : généralités et classification.....	47
2.1.1 Les stilbènes	50
2.1.2 Les acides phénoliques	51

2.1.3	Les flavonoïdes.....	51
2.2	Les propriétés antioxydantes des polyphénols.....	52
2.2.1	La formations des espèces réactives de l'oxygène.....	52
2.2.2	Le stress oxydant dans la maladie d'Alzheimer.....	54
2.3	Le rôle protecteur des polyphénols dans les maladies neurodégénératives.....	55
	Revue 1	59
	Revue 2	67
2.3.1	Le métabolisme du resvératrol.....	75
2.3.2	La <i>trans</i> ϵ -viniférine.....	77
	Objectifs	80
1	Volet 1.....	81
2	Volet 2.....	82
3	Volet 3.....	83
	Méthodologie	85
1	Etude <i>in vivo</i>	86
1.1	Polyphénols utilisés : le resvératrol et la <i>trans</i> ϵ -viniférine.....	86
1.2	Modèle murin de la MA : les souris transgéniques APP ^{swe} PS1 ^{dE9}	86
1.3	Reproduction des animaux.....	87
1.4	Génotypage des animaux.....	88
1.5	Traitement des souris.....	89
1.6	Etude mnésique avec le test du water maze (piscine de Morris).....	89
1.7	Analyse TEP-scan.....	91
1.8	Analyses biochimiques.....	93
2	Etude <i>in vitro</i>	93
2.1	Polyphénols utilisés.....	93
2.2	Modèle SH-SY5Y _{APP^{swe}}	93
2.3	Le traitement.....	94
2.4	Analyses biochimiques.....	94
	Résultats	96
1	Volet 1.....	97
1.1	Comparaison des effets bénéfiques du resvératrol et de la viniférine administrés entre 7 et 11 mois.....	97
	Article 1	104
1.2	Mise en évidence des effets du PEG 200 administré entre 7 et 11 mois chez des souris sauvages.....	140
	Article 2	144

2	Volet 2	163
3	Volet 3	170
	Discussion et perspectives	174
1	Effet de la viniférine <i>versus</i> le resvératrol <i>in vivo</i>	175
1.1	Comparaison des effets de la viniférine et du resvératrol sur les plaques amyloïdes	176
1.2	Comparaison des effets de la viniférine et du resvératrol sur le métabolisme de l'APP	178
1.3	Comparaison des effets de la viniférine et du resvératrol sur le déclin mnésique	178
1.4	Comparaison des effets de la viniférine et du resvératrol sur l'inflammation	181
2	Le choix du véhicule PEG 200 remis en question	182
3	Le choix du modèle animal remis en question	183
4	Quid des oligomères d'A β (A β o) ?	185
5	Effets de la viniférine <i>versus</i> d'autres polyphénols <i>in vitro</i>	185
5.1	Etude du métabolisme de l'APP par quantification des sécrétases et des produits de leur activité	186
5.2	L'étude enzymatique des sécrétases	186
	Conclusion	188
	Références bibliographiques	190
	Résumé	215
	Abstract	216

Liste des figures

Figure 1 : Alois Alzheimer, Auguste Deter et les premiers dessins des neurofibrilles caractéristiques	17
Figure 2 : Evolution spatio-temporelle des dépôts d'A β dans la MA.....	20
Figure 3 : Clivage amyloïdogène de la protéine précurseur APP	21
Figure 4 : Représentation des différentes formes d'A β	22
Figure 5 : Transmission glutamatergique dans les conditions normales.....	23
Figure 6 : Perturbations de la transmission glutamatergique dans la MA	24
Figure 7 : Les trois stades de la DNF extraneuronale dans un cerveau de patient Alzheimer	26
Figure 8 : Progression des DNFs dans le cerveau des patients Alzheimer	26
Figure 9 : Implication de la microglie et des astrocytes dans l'inflammation induite par l'A β et TAU.....	29
Figure 10 : Causes et facteurs de risque des deux formes de la MA	30
Figure 11 : La préséniline dans le complexe de la γ -sécrétase.....	31
Figure 12 : Structure de l'ARNm et des trois principales isoformes protéiques de l'APP	34
Figure 13 : Représentation schématique des deux voies de catabolisme de la protéine APP.....	34
Figure 14 : Version actuelle de la cascade amyloïde	37
Figure 15: Clairance de l'A β	40
Figure 16 : Classification des polyphénols	48
Figure 17 : Structure des stilbènes	50
Figure 18 : Structure chimique de l'acide caféique	51
Figure 19 : Structure des flavonoïdes.....	52
Figure 20 : Origine des radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène.....	53
Figure 21 : Effets des polyphénols sur l'agrégation du peptide amyloïde dans la maladie d'Alzheimer.....	56
Figure 22 : Effets bénéfiques des stilbènes naturels dans des modèles animaux de la MA	58
Figure 23 : Le resvératrol et ses métabolites.....	76
Figure 24 : Structure chimique de la trans ϵ -viniférine.....	77
Figure 25 : Effets du resvératrol (B) et de la trans ϵ -viniférine (C) sur la désagrégation du peptide A β ₁₋₄₂ préalablement agrégé (A)	78
Figure 26 : Effets anti-inflammatoires du resvératrol et de la trans ϵ -viniférine dans un modèle cellulaire de la MA	78
Figure 27 : Chronologie du Volet 1	82
Figure 28 : Chronologie du Volet 2	83
Figure 29 : Chronologie du Volet 3	84

Figure 30 : Chronologie des principales lésions histopathologiques et symptômes.....	87
Figure 31 : Exemple de résultats d'un génotypage	89
Figure 32 : Représentation et exemple de trajectoire dans la piscine de Morris.....	90
Figure 33 : Exemples d'évolution des trajectoires en piscine de Morris pendant la phase d'apprentissage.....	90
Figure 34 : Exemple de trajectoire en piscine de Morris pendant la phase de rétention.....	91
Figure 35 : μ PET SUPER ARGUS de l'unité Inserm U1253, Tours	92
Figure 36 : Principe de détection de l'activité enzymatique des sécrétases.....	95
Figure 37 : Marquage par immunofluorescence des dépôts amyloïdes	97
Figure 38 : Fixation du radiotracer [18F]Florbetaben dans l'hippocampe des souris APPswePS1dE9	98
Figure 39 : Analyse du temps de rétention au jour 5	99
Figure 40 : Variation individuelle du temps de rétention entre 7 et 11 mois.....	100
Figure 41 : Marquage par immunofluorescence des astrocytes	100
Figure 42 : Expression de GFAP et d'IBA1 dans l'hippocampe des souris sauvages et APPswePS1dE9	101
Figure 43 : Marquage par immunofluorescence des astrocytes	102
Figure 44 : Marquage par immunofluorescence des cellules de l'inflammation	141
Figure 45 : Expression de la GFAP dans l'hippocampe de souris sauvages	142
Figure 46 : Dosage de l'IL-1 β par ELISA dans l'hippocampe de souris sauvages.....	142
Figure 47 : Evaluation des dépôts amyloïdes par IF dans l'hippocampe des souris APPswePS1dE9	164
Figure 48 : Evaluation des dépôts amyloïdes par IF dans l'hippocampe des souris APPswePS1dE9 mâles et femelles	164
Figure 49 : Marquage par immunofluorescence des dépôts amyloïdes dans l'hippocampe des souris APPswePS1dE9.....	165
Figure 50 : Temps de rétention des souris sauvages et APPswePS1dE9 à 12 mois	166
Figure 51 : Variation individuelle du temps de rétention entre 3 et 12 mois des souris sauvages et APPswePS1dE9	167
Figure 52 : Marquage par IF de la GFAP chez les souris sauvages et APPswePS1dE9	168
Figure 53 : Marquage par IF de IBA1 chez les souris sauvages et APPswePS1dE9.....	168
Figure 54 : Effets des polyphénols sur l'expression des sécrétases	171
Figure 55 : Effets des polyphénols sur l'expression des fragments issus du clivage de l'APP par les sécrétases	172
Figure 56 : Effets de la viniférine et du resvératrol sur les activités enzymatiques des sécrétases	173

Les figures non réalisées par moi-même sont libres de droit ou ont fait l'objet d'une demande d'autorisation d'utilisation à l'auteur et / ou l'éditeur.

Liste des tables

Table 1 : Critères pour le diagnostic de la MA (A plus B à tout stade)	42
Table 2 : Principaux effets bénéfiques in vitro et in vivo des polyphénols dans la MA.....	49
Table 3 : Nombre de souris APPswePS1dE9 et sauvages utilisées par traitement dans le volet 1 (traitement de 7 à 11 mois).....	88
Table 4 : Nombre de souris APPswePS1dE9 et sauvages utilisées par traitement dans le volet 2 (traitement de 3 à 12 mois).....	88
Table 5 : Liste des anticorps utilisés dans l'étude in vitro	94
Table 6 : Récapitulatif de la comparaison des effets du resvératrol et de la viniférine administrés entre 7 et 11 mois	103
Table 7 : Nombre de souris sauvages utilisées par traitement dans le volet 1	140
Table 8 : Récapitulatif des effets pro-inflammatoires du PEG 200 administré de façon hebdomadaire à des souris sauvages par injection par voie i.p. entre 7 et 11 mois	143
Table 9 : Récapitulatif de la comparaison des effets du resvératrol et de la viniférine.....	169

Liste des abréviations

α -CTF : α C-Terminal Fragment

ADAM : A Disintegrin And Metalloprotease Domain

AICD : APP Intra Cellular Domain

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AMPA : α -Amino-3-hydroxy-5 Méthylisoazol-4-Propionate

Aph-1 : Anterior pharynx defective 1 homolog

ApoE : Apolipoprotéine ϵ

APP : Amyloid Protein Precursor

ATP : Adénosine TriPhosphate

A β : Peptide β amyloïde

A β o : Oligomères d'A β

BACE1 : Beta-site APP Cleaving Enzyme 1

BHE : Barrière Hémato Encéphalique

CCL : Chemokine (C-C motif) Ligand

CDR-SB : Clinical Dementia Rating Sum of Box

CTF : C-Terminal Fragment

COMETHEA : COMité d'ETHique pour l'Expérimentation Animale

CXCL : Chemokine (C-X-C motif) Ligand

DNFs : Dégénérescences NeuroFibrillaires

EAAT : Excitatory Amino Acid Transporter

EEG : ElectroEncéphaloGramme

EGCG : Gallate d'EpiGalloCatéchine

EROs : Espèces Réactives de l'Oxygène

FDA : Food and Drug Administration

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

HAS : Haute Autorité de Santé

IBA-1 : Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1

IDE : Insulin Degrading Enzyme

IF : ImmunoFluorescence

IFN- γ : InterFéron γ

IL- : InterLeukine

i.p : intrapéritonéale

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

IWG : International Working Group

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LPS : LipoPolySaccharide

LRP1 : Low density lipoprotein receptor-Related Protein 1

LTP : Potentialisation à Long Terme

MA : Maladie d'Alzheimer

MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein 1

MIND : Mediterranean-Dash Intervention of Neurodegenerative Delay

MIP : Macrophage Inflammatory Protein

MP : Maladie de Parkinson

NCT : NiCasTrine

NEP : NEPrilysin

NMDA : N-Methyl-D-Aspartate

NS : Non Significatif

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG 200 : PolyEthylène Glycol 200

Pen-2 : Presenilin enhancer 2

P-gp : Permeability-GlycoProtein

PHFs : Paired Helical Filaments

PIB : Produit Intérieur Brut

PrP : Prion Protein

PS1 / 2 : Préséniline 1 / 2

RAGE : Receptor for Advanced Glycation End products

RANTES : Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SNC : Système Nerveux Central

SNP : single nucleotide polymorphism

SOD : SuperOxyde Dismutase

TAU : Tubulin-Associated Unit

TEP : Tomographie par Emission de Positron

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

TREM2 : Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2

TSPO : Translocator Protein

WM : Water Maze (piscine de Morris)

Introduction

1 La Maladie d'Alzheimer

1.1 La découverte par Aloïs Alzheimer

Aloïs Alzheimer (1864-1915) était un psychiatre allemand, mais également chercheur passionné par les relations entre le psychisme et le cerveau. Cette activité se trouvait, à cette époque, à la frontière entre la psychiatrie et la neurologie. Le 25 novembre 1901, l'hospitalisation d'Auguste Deter (1850-1906) marqua un tournant pour la communauté scientifique (Alzheimer et al., 1995). En effet cette patiente, internée à l'âge de 51 ans pour des troubles de mémoire sévères et une agitation anxieuse, a été très rapidement examinée par le célèbre docteur. Son dossier médical que l'on croyait perdu a cependant été retrouvé en 1995 et c'est ainsi que nous pouvons découvrir les premiers échanges entre Aloïs Alzheimer et Auguste Deter (Alzheimer et al., 1995 ; Dubois, 2019) :

- « *Comment vous appelez vous ?*
- *Auguste*
- *Votre nom de famille ?*
- *Auguste*
- *Comment s'appelle votre mari ?*
- *Auguste, je crois*
- *Etes-vous mariée ?*
- *A Auguste je crois*
- *Depuis combien de temps êtes-vous ici ?*
- *3 semaines. »*

Manifestement cette patiente présentait des troubles majeurs de la mémoire, des difficultés de langage, une dénomination et des calculs erronés, d'après les observations d'Aloïs Alzheimer. Ces symptômes rencontrés au cours de la démence sénile étaient considérés à l'époque comme résultant d'un durcissement des artères du cerveau lié au grand âge.

Cette patiente encore jeune présentait, selon Alzheimer, une altération du cerveau, chose qui expliquait selon lui ces troubles mentaux observés. Après le décès de cette patiente le 8 avril 1906, son cerveau a été examiné morphologiquement à l'œil nu et plus en détail de manière microscopique. Alzheimer observa tout d'abord une importante atrophie cérébrale avec un élargissement des sillons de la surface du cerveau. L'examen microscopique révéla deux types d'anomalies au sein du cortex cérébral. Premièrement il mit en évidence une modification de la

structure de certains neurones grâce à la technique d'imprégnation argentique. Ce phénomène est plus connu aujourd'hui sous le nom de dégénérescences neurofibrillaires (DNFs) (**figure 1**). Deuxièmement, il montra une accumulation de dépôts métaboliques formant des plaques. Ces plaques sont mises en évidence grâce au rouge Congo, une coloration qui permet notamment de visualiser l'amylose d'où le nom de plaques amyloïdes.

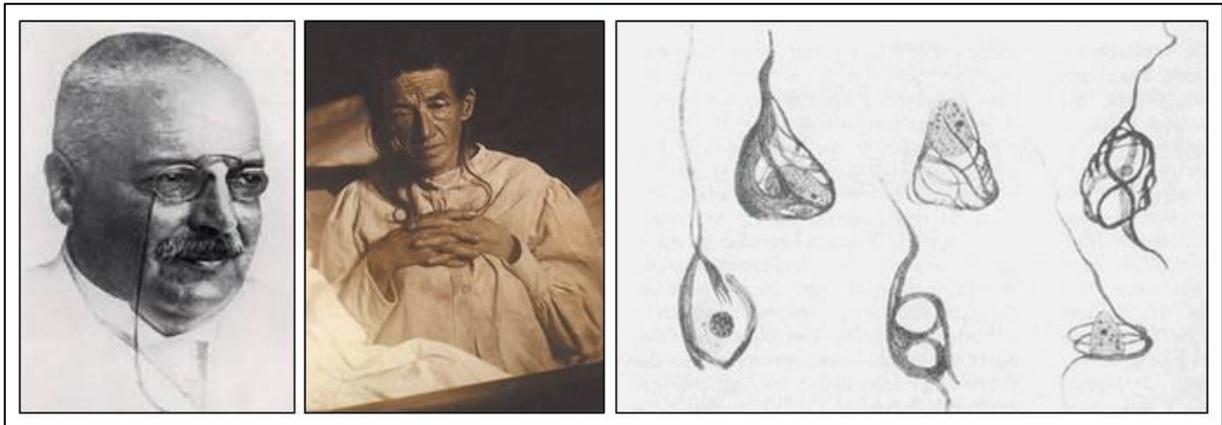


Figure 1 : Alois Alzheimer, Auguste Deter et les premiers dessins des neurofibrilles caractéristiques

A gauche : portrait d'Alois Alzheimer ; Au centre : portrait d'Auguste Deter ;

A droite : dégénérescences neurofibrillaires dessinées par Alois Alzheimer

(Alzheimer et al., 1995)

C'est le 4 novembre 1906, lors de la 37^{ème} réunion de psychiatrie à Tübingen, que le docteur Alzheimer a présenté ces travaux à ses confrères. Un état démentiel et délirant était jusqu'alors considéré comme d'origine psychiatrique. Pour la première fois dans l'histoire des neurosciences, Alzheimer a associé ces troubles mentaux à des altérations de neurones et des lésions cérébrales. Le docteur Alois Alzheimer décrivait ainsi la démence comme étant une maladie du cerveau. Il a ensuite continué ces études, conduisant à l'écriture d'un article relatant d'autres cas ayant en commun l'apparition et l'installation rapides de troubles psychiques de la mémoire et du comportement chez des sujets sans antécédent psychiatrique, relativement jeunes (de moins de 65 ans) et dont l'examen *post mortem* du cerveau avait montré une altération des fibrilles interneuronales ainsi que la présence de plaques amyloïdes dans le cortex cérébral. Le docteur Kraepelin, psychiatre mondialement connu à l'époque, choisit de baptiser cette maladie neurodégénérative « maladie d'Alzheimer » (MA) en hommage à l'acharnement du docteur Alzheimer dans le suivi et l'exploitation du dossier de sa première patiente Auguste Deter. Il faudra attendre 1960 pour que deux neuropathologistes anglais, les docteurs Martin Roth et Barnard Tomlinson, associent les lésions cérébrales observées dans la MA et les troubles cognitifs présentés chez des patients vivants souffrant de démence sénile. C'est en 1976 que le docteur

Robert Katzman proposa de ne plus limiter le terme de MA aux seuls patients jeunes mais de l'élargir à l'ensemble des patients atteints de démence sénile (Katzman, 1976). Ainsi, il considéra la MA, auparavant peu diagnostiquée, comme la maladie la plus répandue du XX^{ème} siècle. En effet selon lui il s'agissait de la quatrième ou la cinquième cause de décès aux États-Unis. Près d'un siècle après la mort d'Auguste Deter, des études génétiques réalisées à partir de prélèvements cérébraux conservés dans le laboratoire d'Alzheimer ont permis d'établir que la maladie qu'elle présentait correspondait à une forme génétique liée à une mutation sur le gène codant pour la préséniline 1 (PS1).

1.2 Incidence et prévalence de la maladie d'Alzheimer

Les travaux d'Alois Alzheimer furent sous-considérés pendant la majeure partie du XX^{ème} siècle. Dans le monde, on estime à 35 millions le nombre de malades. La MA touche 1 personne sur 20 à partir de 65 ans et plus d'une personne sur 4 après 85 ans. Alors que sa survenue avant 65 ans est rare (0,5 %), sa fréquence est de 2 à 4 % après 65 ans. Elle augmente proportionnellement, pour dépasser 20 % à 80 ans. Cette maladie touche de plus en plus de femmes au fur et à mesure que l'âge augmente (1 femme sur 4 et 1 homme sur 5 après 85 ans). Les conséquences sociales et humaines de la MA ont des répercussions économiques écrasantes. Selon le rapport mondial Alzheimer 2015, les coûts globaux de la démence ont augmenté de 35 % entre 2010 et 2015 pour atteindre 818 milliards de dollars soit 1 % du PIB (produit intérieur brut) mondial.

En France, on estime que 900 000 personnes souffrent de démence de type Alzheimer, dont 97 000 à 130 000 malades de plus de 65 ans dans la région Nouvelle Aquitaine. Ce chiffre, en constante augmentation, est certainement encore sous-évalué, car on estime que seulement 1 personne sur 2 serait diagnostiquée. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette sous-estimation du diagnostic, comme par exemple les premiers stades légers de la maladie ou les outils diagnostiques disponibles parfois non adaptés. De plus, rappelons qu'un diagnostic certain ne peut être effectué qu'au moment de l'analyse anatomopathologique *post mortem*. La France arrive en septième position en ce qui concerne la prévalence, ce qui conduit à un coût global de 10 milliards d'euros par an, la moitié de ce montant étant assumé par les familles. Trois plans Alzheimer ont été proposés depuis les années 2000, pour la prise en charge médico-sociale, l'amélioration des conditions du diagnostic, de la prise en charge et aussi de la recherche. Depuis, la France est devenue une figure d'exemple pour les pays industrialisés dans le domaine des démences. Plusieurs pays se sont engagés dans la lutte à la suite des différentes mesures prises par la France : c'est le cas en Europe de la Grande Bretagne, l'Irlande et les pays scandinaves.

1.3 Les lésions histopathologiques

La MA apparaît dès l'examen macroscopique comme étant caractérisée par une atrophie du cortex cérébral qui résulte de la mort des neurones. Même si une perte neuronale modérée s'observe au cours du vieillissement, cette atrophie est beaucoup plus prononcée dans la MA avec notamment la présence de circonvolutions cérébrales plus fines et de sillons plus élargis. La mort neuronale est la conséquence de nombreux dysfonctionnements, tels que des modifications de fonctionnement des neurones, une inflammation exacerbée et la présence de protéines anormales mal conformées. Les lésions extra-neuronales ou intra-neuronales observées dans la MA sont présentes essentiellement dans le cortex, signifiant une maladie de la substance grise correspondant aux corps cellulaires des neurones. Deux types de lésions principales sont observées dans le cortex et précédemment décrites par Alois Alzheimer : les plaques amyloïdes et les DNFs. Par la suite, d'autres études ont révélé la présence de ces deux lésions principales dans d'autres structures cérébrales, notamment l'hippocampe et l'amygdale, conduisant les neuropathologistes de l'époque à définir des critères microscopiques strictes pour le diagnostic histopathologique de la MA (Markesbery, 1997).

1.3.1 Les plaques amyloïdes

Alzheimer, à l'origine de la découverte de ces plaques, les a décrites comme des « *foyers miliaires causés par le dépôt d'une substance particulière dans le cortex* » (Alzheimer et al., 1995). Cependant, malgré cette découverte, l'origine de cette « substance particulière » resta inconnue pendant 80 ans. Ce n'est qu'en 1984 que George Glenner isola le peptide β amyloïde ($A\beta$) pour la première fois à partir de cerveaux de patients porteurs d'une trisomie 21 ou atteints de la MA (Glenner and Wong, 1984). Ce peptide a été isolé à partir de dépôts amyloïdes cérébrovasculaires et fut ensuite séquencé pour être identifié comme le composant essentiel des plaques amyloïdes (Masters et al., 1985). L'analyse biochimique de ces plaques a ainsi montré que la protéine qui constituait ces amas était une protéine constituée de 42 acides aminés aujourd'hui appelé le peptide β -amyloïde. La présence de certains acides aminés conduit à une conformation particulière, résultant d'un repli de ce peptide sous forme de feuillets plissés de conformation dite « β ». Ces feuillets β sont insolubles et vont agir comme des aimants ayant tendance à s'agréger jusqu'à former des amas insolubles de plus en plus volumineux, les plaques amyloïdes (Chen et al., 2017). Ces dépôts amyloïdes arrivent précocement dans la MA car il a été mis en évidence que des patients présentent des taux élevés d' $A\beta$ dans le cortex dès le stade léger ou asymptomatique (Ingelsson et al., 2004). Les différents stades d'évolution de la MA ont été corrélés avec la

diffusion du peptide amyloïde en 2002 (Thal et al., 2002). Celle-ci se divise en cinq phases caractéristiques suivant un modèle d'apparition chronologique des dépôts d'A β (**figure 2**).

- Dans la phase 1, l'A β se dépose de manière diffuse dans le néocortex.
- Dans la phase 2, l'A β diffuse dans le cortex entorhinal, la région CA1 de l'hippocampe et le cortex insulaire.
- Dans la phase 3, les dépôts amyloïdes se retrouvent dans le noyau caudé, le putamen, le claustrum, le noyau basal, le thalamus, l'hypothalamus et la substance blanche.
- Dans la phase 4, ces mêmes dépôts sont retrouvés dans le noyau olivaire inférieur, la substance noire, le CA4, le colliculus supérieur et inférieur et le noyau rouge.
- Dans la phase 5, les dépôts d'A β se localisent dans le cervelet, le noyau pontin, le locus coeruleus, le noyau réticulo-tegmental, le noyau dorso-tegmental et le noyau raphé.

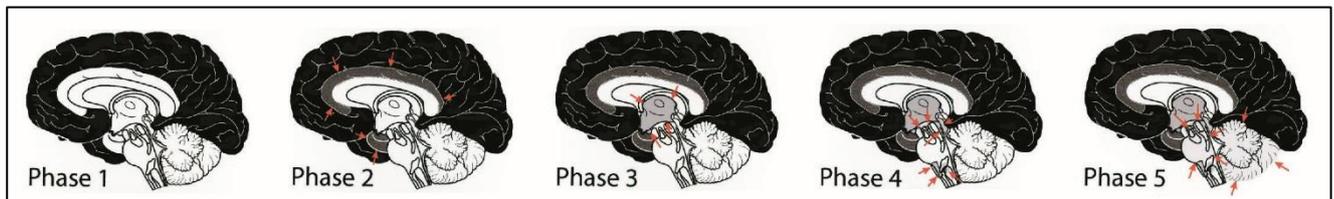


Figure 2 : Evolution spatio-temporelle des dépôts d'A β dans la MA

Les 5 phases de Thal

D'après (Thal et al. 2002)

Ce peptide amyloïde est produit par le clivage de son précurseur, l'APP (amyloid protein precursor). Ce précurseur amyloïde est une protéine transmembranaire de type I (dont le domaine N-terminal est dirigé vers la lumière du réticulum endoplasmique pendant la biosynthèse), codée par un gène localisé sur le chromosome 21 (Goldgaber et al., 1987). Le peptide est libéré par l'action conjointe de deux enzymes protéolytiques, les β - et γ -sécrétases dans la voie dite amyloïdogène (**figure 3**), pour se retrouver sous forme libre, monomérique qui peut dans un second temps s'oligomériser (Agostinho et al., 2015). Les fragments générés par le clivage de la γ -sécrétase varient selon leur nombre d'acides aminés, la majorité ayant 40 ou 42 acides aminés. Environ 90 % de ces peptides A β générés sont des peptides dits A β_{1-40} . Ils contiennent 40 acides aminés et sont peu hydrophobes. Les peptides A β_{1-42} , quant à eux, comportent 42 acides aminés et possèdent un fort pouvoir d'agrégation. Ce sont les constituants majeurs des plaques amyloïdes car, en raison de leur hydrophobie plus élevée que celle des peptides A β_{1-40} et donc de leur solubilité plus faible, ils s'agrègent plus facilement pour former des fibrilles (Sgourakis et al., 2007 ; Takahashi et al., 2017). C'est la coupure par la γ -sécrétase au niveau des résidus 711 ou

713 de l'APP qui conditionne la taille du peptide A β généré qui sera de 40 ou 42 acides aminés respectivement (Selkoe, 2001).

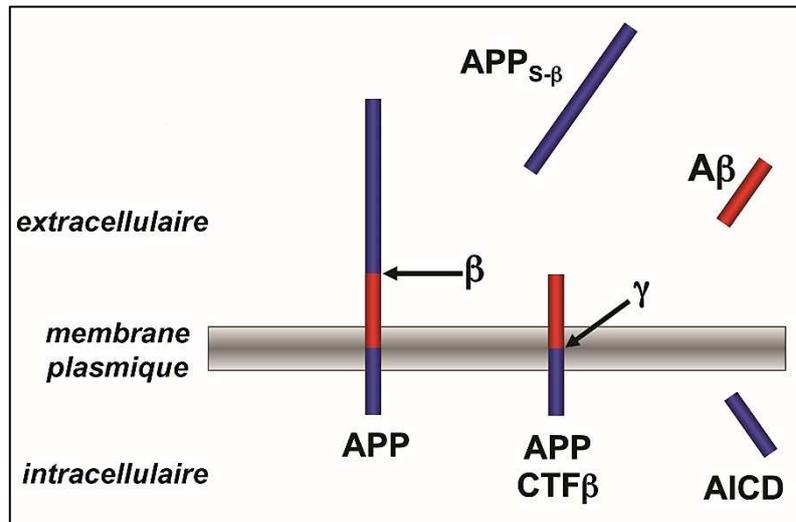


Figure 3 : Clivage amyloïdogène de la protéine précurseur APP

AICD : APP intracellular domain ; APPCTF β : C-terminal fragment ; APPS- β : Soluble APP

D'après (Walter, 2015)

Dans la MA, la production du peptide A β_{1-42} est augmentée, ce qui peut être due à la suractivation de la voie amyloïdogène, à des mutations affectant la synthèse du peptide ou à des dysfonctionnements au niveau des mécanismes d'élimination du peptide A β (Li et al., 2007).

Ainsi, le peptide amyloïde, une fois sécrété, est retrouvé sous différents  tats conformationnels tels que des formes intermédiaires solubles comme les monomères et les oligomères, mais également sous des formes insolubles en feuillets β comme les fibrilles à l'origine de la formation des plaques amyloïdes (**figure 4**). Cependant, aucune corrélation directe entre les plaques amyloïdes et la perte synaptique et neuronale n'a été démontrée dans la MA (Spires-Jones and Hyman, 2014 ; Terry et al., 1991a). La détection d'oligomères d'A β (A β_o) solubles dans le parenchyme cérébral humain a été signalé quant à lui pour la première fois en 1994 (Frackowiak et al., 1994).   l'époque, les A β_o étaient considérés comme des intermédiaires de la genèse des plaques amyloïdes considérées alors comme la forme pathogène de l'A β . Aujourd'hui, les scientifiques s'accordent à dire que les A β_o sont la forme la plus toxique d'A β et qu'ils peuvent se propager au sein du cerveau (Hayden and Teplow, 2013 ; Lee et al., 2017b). Leur accumulation se produit souvent très tôt au cours de la MA, avant les plaques (Lesné et al., 2013 ; Mroczko et al., 2018). En effet, des études *in vitro* et *in vivo*, utilisant respectivement des cultures primaires de neurones (Gouras et al., 2000) et des animaux transgéniques APP/PS1 ont montré la présence intracellulaire de ce peptide (Ripoli et al., 2014), notamment à l'intérieur des synapses (Pickett et al., 2016). Il semblerait donc que

l'accumulation intracellulaire des A β soit un événement antérieur à la formation des plaques séniles et soit responsable des dysfonctionnements synaptiques et cognitifs observés dans la MA.

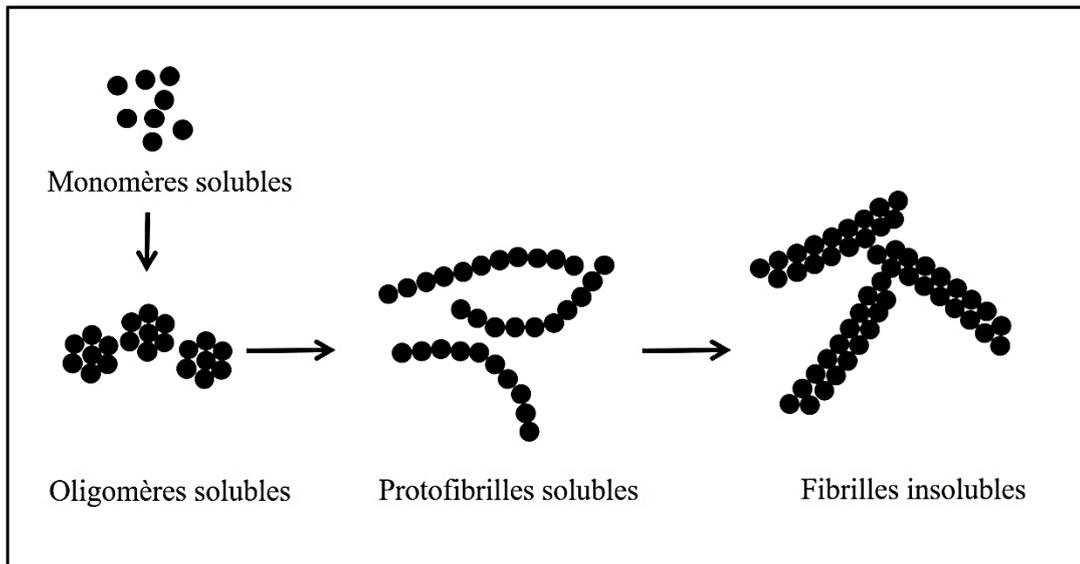


Figure 4 : Représentation des différentes formes d'A β

Le peptide amyloïde, une fois sécrété, peut en temps normal être dégradé par les cellules gliales ou éliminé du parenchyme cérébral grâce à des récepteurs et transporteurs spécifiques situés au niveau de la barrière hémato encéphalique (BHE) (cf 1.6.1). Mais, dans les conditions pathologiques, ce système d'élimination se retrouve vite surpassé, d'autant plus qu'il n'est plus totalement efficace. Il n'assure donc plus correctement sa fonction de clairance et le peptide amyloïde va donc s'agréger (Yamazaki and Kanekiyo, 2017). C'est ainsi que les A β seraient à l'origine d'une succession de réactions biologiques qui pourraient conduire à la mort des neurones. Parmi ces réactions biologiques, on peut citer l'internalisation des récepteurs glutamatergiques NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate) par endocytose (Snyder et al., 2005 ; Zhao et al., 2010). La disparition de ces récepteurs glutamatergiques serait responsable de la diminution de la densité des récepteurs NMDA dans la synapse, d'où une diminution de la transmission glutamatergique et donc de la potentialisation à long terme (LTP) qui joue un rôle essentiel dans la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémorisation (Snyder et al., 2005). Cette baisse d'expression des récepteurs NMDA dans l'hippocampe a par ailleurs été observée dans plusieurs études *post-mortem* chez des sujets atteints de la MA (Jacob et al., 2007).

De plus, le glutamate se trouve en excès au sein de l'espace synaptique dans la MA à cause de la diminution de l'activité des transporteurs astrocytaires dont les EAAT (Excitatory Amino Acid Transporter) qui n'assurent plus la recapture glutamatergique. En effet, les transporteurs EAAT1

et EAAT2 sont initialement présents à la surface des astrocytes afin de réguler l'excès de glutamate dans la fente synaptique (**figure 5**).

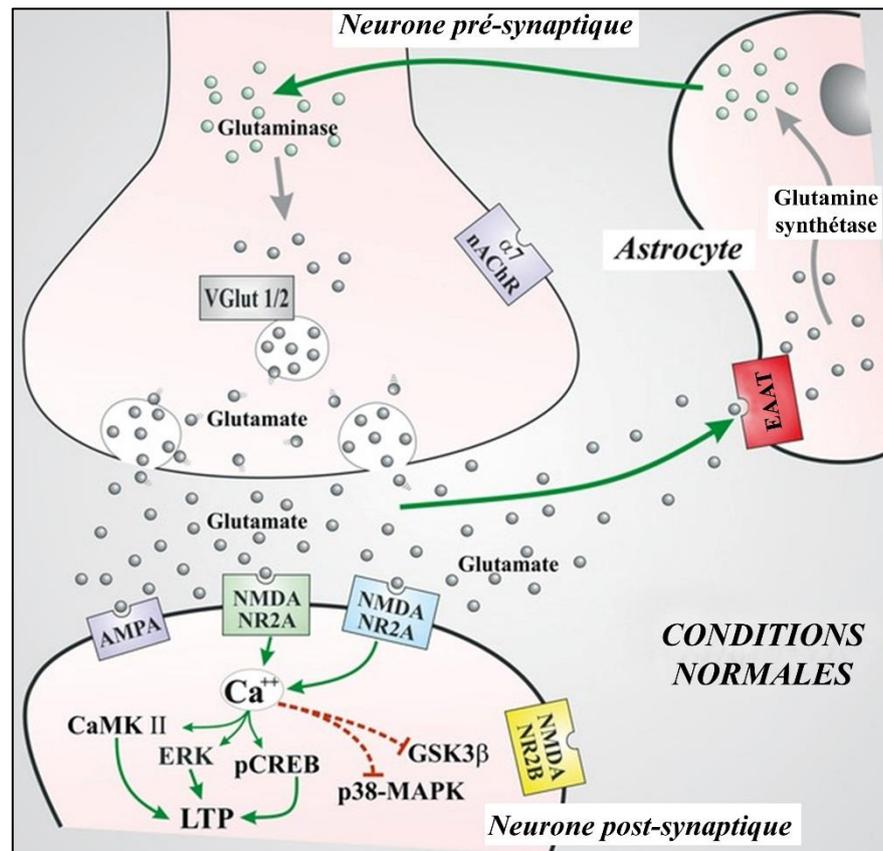


Figure 5 : Transmission glutamatergique dans les conditions normales

D'après (Esposito et al., 2013)

L'augmentation des A β observée lors de la MA altère les mécanismes d'absorption du glutamate en altérant la fonction des transporteurs astrocytaires et conduisant ainsi à une augmentation de sa concentration dans la fente synaptique (Jacob et al., 2007 ; Li et al., 1997 ; Texidó et al., 2011).

Une excitotoxicité glutamatergique est alors observée par activation exagérée de l'ensemble des récepteurs NMDA extrasynaptiques (en particulier NR2B) présents sur l'axone, induisant toute une cascade d'événements délétères, dont une réduction de l'afflux de calcium dans les épines dendritiques, conduisant à la perturbation des voies de signalisation cellulaire et à la mort neuronale (Esposito et al., 2013) (**figure 6**). Ce recrutement des récepteurs extrasynaptiques pourrait expliquer pourquoi les A β inactivent certaines voies cellulaires au détriment d'autres voies induisant la phosphorylation de la protéine TAU (Wang et al., 2004).

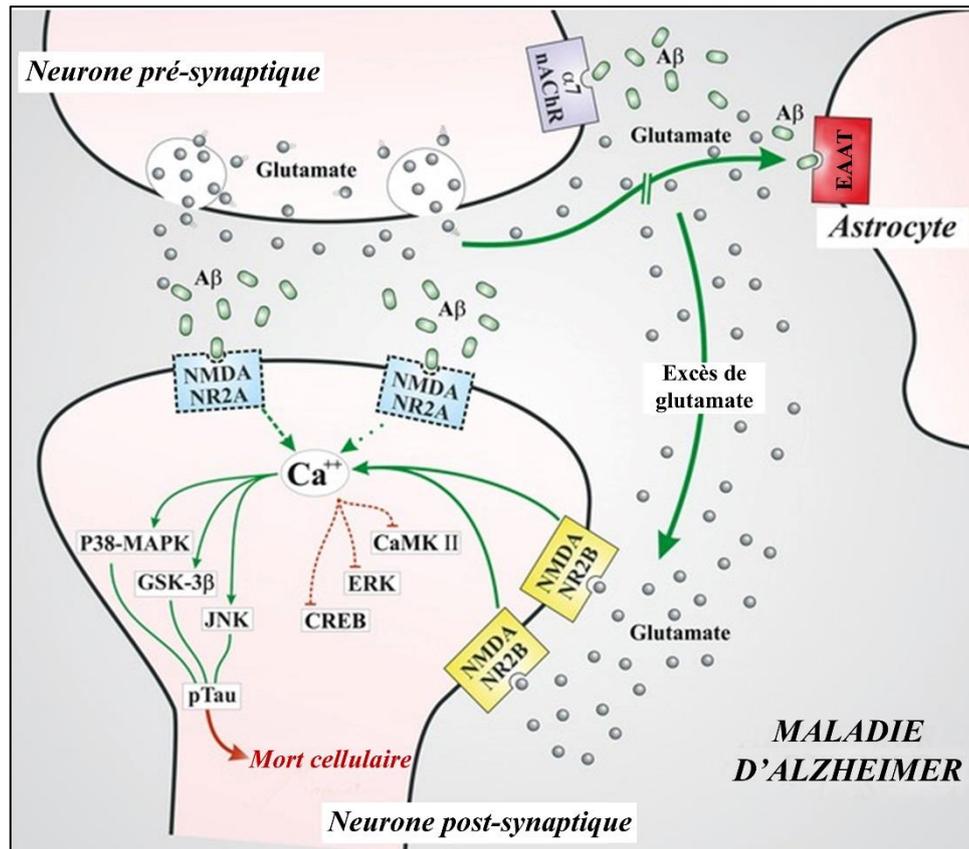


Figure 6 : Perturbations de la transmission glutamatergique dans la MA

D'après (Esposito et al., 2013)

Dans ce contexte, plusieurs études apportent des arguments en faveur de l'existence d'interactions entre les A β et le processus d'excitotoxicité (Cacabelos et al., 1999 ; Findley et al., 2019 ; Wenk et al., 2006). L'altération de la recapture du glutamate apparaît ainsi déterminante dans la participation du glutamate à la mort cellulaire au cours de la MA.

Des taux élevés d'A β entraînent également un rétrécissement des épines dendritiques, la partie post-synaptique de la synapse. Cette baisse de densité des épines dendritiques est accompagnée par une diminution du niveau de débrine, une protéine du cytosquelette qui module la plasticité synaptique (DeKosky and Scheff, 1990 ; Terry et al., 1991a). De plus, il a été démontré que l'activation des récepteurs NMDA extrasynaptiques induirait des dysfonctionnements mitochondriaux aboutissant à un stress oxydant (Anandatheerthavarada et al., 2003 ; Guo et al., 1999).

1.3.2 Les dégénérescences neurofibrillaires

Les DNFs sont caractérisées, selon Aloïs Alzheimer, par des « *enchevêtrements épais de neurofilaments dans le cytoplasme des neurones* » (Alzheimer et al., 1995). La structure de ces neurofilaments fut observée pour la première fois en 1963, avec des filaments appariés sous forme

d'hélices (Paired Helical Filaments, PHFs) (Kidd, 1963). La purification des DNFs chez des patients atteints de la MA a permis l'identification d'une protéine d'approximativement 50 kDa par électrophorèse en conditions dénaturantes (Iqbal et al., 1974 ; Iqbal and Tellez-Nagel, 1972). Cette protéine naturelle contribue au bon fonctionnement des neurones, en constituant les microtubules, tunnels intraneuronaux qui permettent la propagation des protéines synthétisées par les neurones et leur acheminement vers les terminaisons nerveuses (Grundke-Iqbal et al., 1979). Indépendamment, une nouvelle protéine composante des microtubules fut identifiée par le groupe de Marc Kirschner dans le milieu des années 1970. Celle-ci fut nommée TAU « Tubulin-Associated Unit » (Weingarten et al., 1975). Mais ce n'est qu'en 1985 qu'une équipe de chercheurs révéla que des anticorps dirigés contre la protéine TAU permettaient de mettre en évidence les PHFs (Brion et al., 1985). Au cours de la MA, la protéine TAU est hyperphosphorylée sur de nombreux sites, ce qui modifie sa fonction. Cette forme hyperphosphorylée a ainsi été mise en cause dans la formation des PHFs (Grundke-Iqbal et al., 1986 ; Kosik et al., 1986). Sous cette forme, elle ne peut plus stabiliser les neurones qui se déstructurent eux-mêmes et ne transportent plus leurs produits de synthèse comme les neurotransmetteurs, notamment l'acétylcholine (Rajmohan and Reddy, 2017). La fonction du neurone est altérée et ce dernier se rigidifie ce qui conduit à sa mort.

Il y a ensuite une propagation de la pathologie TAU d'un neurone à l'autre (De Calignon et al., 2012 ; Takeda, 2019). Cette propagation de TAU a été mise en évidence dans plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro* (Boluda et al., 2015 ; Clavaguera et al., 2009 ; Frost et al., 2009) et rappelle le mode de répllication du prion, un agent infectieux composé uniquement de protéines (Prusiner, 1994). Par des techniques d'immunohistochimie, différents stades de maturité des DNFs ont été mis en évidence (**figure 7**). Chaque stade est corrélé à des niveaux d'hyperphosphorylation différents de la protéine TAU (Augustinack et al., 2002 ; Kimura et al., 1996 ; Morishima-Kawashima et al., 1995).

- Le stade « Pré-DNFs » qui correspond à un stade pré-PHF caractérisé par la protéine TAU hyperphosphorylée mais non fibrillée.
- Le stade « DNF intraneuronale » qui apparait à un stade plus avancé de la pathologie, caractérisé par un marquage dense de la protéine TAU fibrillaire au niveau du soma.
- Le stade « DNF extraneuronale » caractérisé par un marquage filamentaire signe d'un neurone atrophique.

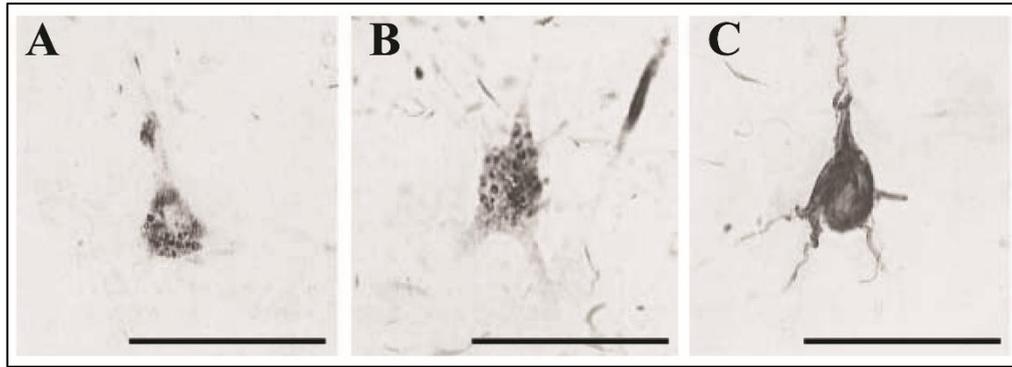


Figure 7 : Les trois stades de la DNF extraneuronale dans un cerveau de patient Alzheimer

A : Pré-DNF, B : DNF intraneuronale, C : DNF extraneuronale. Barre d'échelle : 50 μ m.

(Augustinack et al., 2002)

Enfin, l'analyse de la diffusion des DNFs dans le cerveau des patients atteints de la MA a permis de conclure que les régions corticales sont touchées dans un ordre stéréotypé (Braak and Braak, 1991). Il existe donc une « hiérarchie » lésionnelle corrélée au déclin cognitif. Ces 6 stades sont aujourd'hui connus sous le nom de stades de Braak (**figure 8**).

- Les stades I-II caractérisés par les DNFs au niveau de la région trans-entorhinale.
- Les stades III-IV caractérisés par les DNFs dans le cortex trans-entorhinal ainsi que par une propagation à la région entorhinale.
- Les stades V-VI qui correspondent à une augmentation des DNFs dans les structures précédemment citées et par une extension au néocortex.

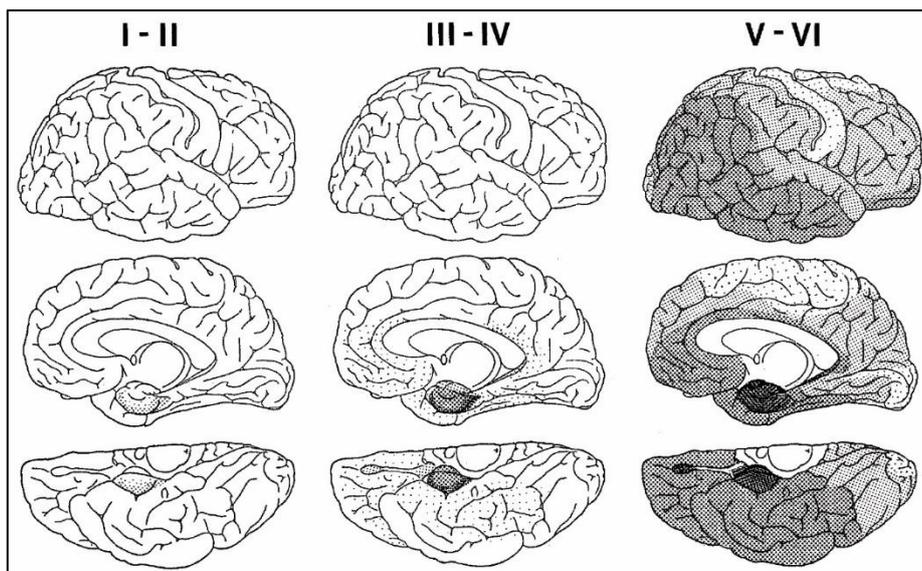


Figure 8 : Progression des DNFs dans le cerveau des patients Alzheimer

(Braak et Braak 1991)

La question de savoir si les DNFs sont une conséquence des dépôts amyloïdes ou bien la cause sous-jacente de la MA entraînant la formation des plaques amyloïdes est une question encore non élucidée à ce jour (Naseri et al., 2019). Cependant, des travaux permettent d'apporter quelques éléments de réponse. L'A β seul est capable d'induire la formation de DNFs (Jin et al., 2011) qui sont nécessaires au développement de la MA et à sa symptomatologie. En effet, la propagation des DNFs en dehors de la région temporale entraîne l'apparition de symptômes spécifiques en raison de la spécialisation des aires corticales (Asuni et al., 2007). Ainsi, dans la MA, ce sont les troubles mnésiques qui sont en premier lieu observés car les lésions de la maladie sont localisées dans un premier temps dans l'hippocampe et le cortex entorhinal. D'autres fonctions vont ensuite être altérées comme la capacité à gérer les émotions, impliquant le système limbique, la maîtrise de l'espace, gérée par le cortex pariétal et enfin le langage, faisant intervenir le cortex temporal.

La physiologie de la protéine TAU ne sera pas développée en détail dans cette partie, les modèles expérimentaux utilisés dans cette thèse étant dépourvus de cette composante de la MA.

1.3.3 La neuroinflammation

L'activation des cellules gliales est une autre composante essentielle de la MA, qui fût mise en évidence la première fois par Alois Alzheimer lors de l'analyse histopathologique du cerveau de sa patiente Auguste Deter (Alzheimer et al., 1995). En effet, Alzheimer a décrit très brièvement la glie dans son rapport de 1907 comme ayant « *développé de nombreuses fibres, de plus en plus nombreuses* » faisant certainement référence ici aux cellules astrocytaires. Deux populations de cellules gliales sont trouvées réactives dans le cerveau de patients, les astrocytes et la microglie qui participent activement à la neuroinflammation et qui sont toujours retrouvés à proximité des plaques amyloïdes (Bagyinszky et al., 2017 ; Hansen et al., 2018) (**figure 9**).

Les astrocytes sont des cellules de soutien des neurones, indispensables à leur bon fonctionnement, en intervenant notamment dans la formation des synapses, dans le recyclage des neurotransmetteurs, dans l'homéostasie ionique et métabolique ainsi que dans la production de facteurs neurotrophiques (Markiewicz and Lukomska, 2006). Dans le contexte pathologique de la MA, ces astrocytes adoptent une morphologie « en étoile » avec un épaissement des prolongements et une augmentation de l'expression de la GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Pekny and Nilsson, 2005).

La microglie représente quant à elle le « *système immunitaire cérébral* » du cerveau. Ces cellules émettent des prolongements vers les neurones et les astrocytes, leur permettant ainsi d'assurer une veille immunitaire de l'ensemble du cerveau (Nimmerjahn et al., 2005). La microglie est surtout

connue pour son activité de phagocytose permettant l'élimination des neurones apoptotiques, des déchets, des pathogènes mais elle sécrète aussi des facteurs de remodelage tissulaire (Streit and Xue, 2009). Pour cela, la microglie en temps normal très arborisée, perd ses ramifications et augmente le volume de son corps cellulaire pour devenir amiboïde lors de son activation. Sous cette forme, la microglie possède alors des capacités phagocytaires de macrophage et de sécrétion de cytokines (Hickman et al., 2018). Les cytokines sécrétées en réponse à la présence d'A β sont essentiellement l'IL-1 β (Interleukine-1 β), le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), l'IL-6 et l'INF- γ (Interféron γ) (Lue et al. 2001), des chimiokines CCL3 (Chemokine (C-C motif) Ligand 3) (ou MIP1 α (Macrophage Inflammatory Protein 1- α)), CCL4 (ou MIP1 β), CXCL8 (CXCL : Chemokine (C-X-C motif) Ligand 8), CCL5 (ou RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted)), CCL-2 (ou MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1)) (El Khoury and Luster, 2008). Par ailleurs, il y a également une augmentation des EROs (espèces réactives de l'oxygène) (Coraci et al., 2002) et des composants du complément, faisant partie de l'immunité innée comme le C1q, C3, C4 et C9 (Walker et al., 1995).

La relation entre l'activation de ces deux types de cellules gliales et la neurodégénérescence caractéristique de la MA est encore incomprise. Elle fut d'abord considérée comme un phénomène accompagnant les phases tardives de la MA, ne contribuant pas de manière significative à la pathologie (Wyss-Coray, 2006). Cependant, une analyse corrélative entre des patients présentant des symptômes de la MA et des marqueurs de l'inflammation retrouvés dans leur liquide céphalo-rachidien (LCR) a démontré la présence d'un processus inflammatoire témoignant une implication beaucoup plus précoce du système immunitaire, ce qui indique que l'inflammation du SNC (système nerveux central) est une des premières caractéristiques de la pathogénicité de la MA (Heppner et al., 2015). De plus, des études génétiques et bio-informatiques ont démontré l'implication d'un système immunitaire suractivé et délétère, contribuant ainsi à la progression et la gravité de la MA (Zhang et al., 2013). En effet, des études d'association à l'échelle du génome ont montré l'implication de certains gènes qui seraient liés à un risque accru de développer la MA. On retrouve ainsi dans cette étude la mutation faux-sens R47H de TREM2 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2), un récepteur participant à l'activation de la réponse immunitaire dans la microglie, est associée au risque de MA en dérégulant la neuroinflammation et augmentant la pathologie de la MA (Guerreiro et al., 2013). Le CD33, une protéine transmembranaire présente sur les cellules à activité phagocytaire, est aussi impliqué dans la pathogenèse de la MA. Plusieurs polymorphismes mononucléotidiques (SNP (single nucleotide polymorphism)) du gène codant pour CD33 ont été identifiés comme facteurs de risque pour la MA (Bertram et al., 2008 ;

Newcombe et al., 2018). De plus, une expression accrue de CD33 serait associée au déclin cognitif chez les patients atteints de démence (Karch et al., 2012).

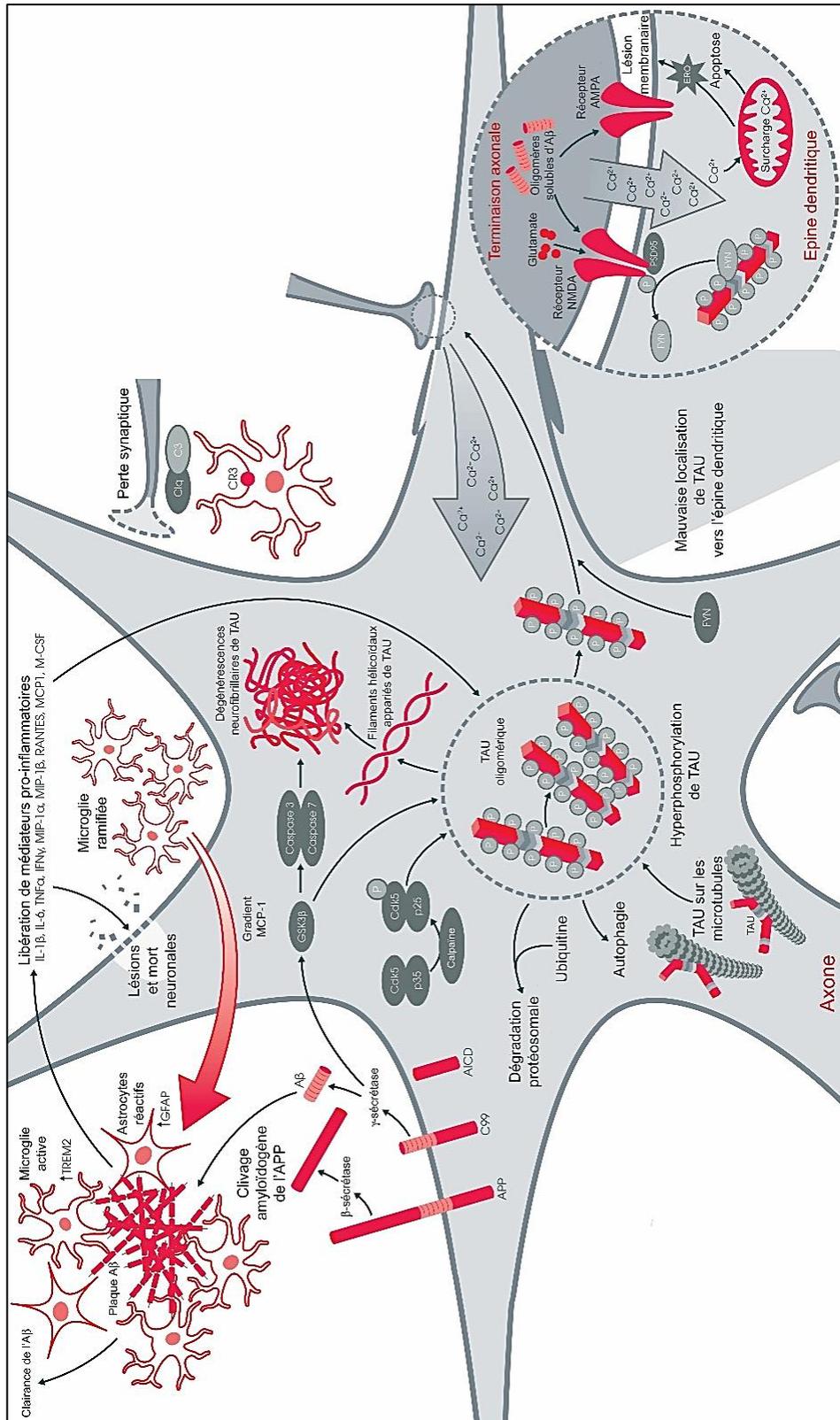


Figure 9 : Implication de la microglie et des astrocytes dans l'inflammation induite par l'Aβ et TAU

D'après ABCAM

1.4 Les facteurs de risque

On ne connaît pas encore de façon précise la cause de l'apparition des lésions. Il est pourtant certain que l'âge joue un rôle essentiel. A cela, deux conditions non modifiables de facteurs de risque s'ajoutent : le sexe et la prédisposition génétique. Les femmes sont le plus souvent atteintes car elles vivent plus longtemps et sont donc naturellement plus exposées à exprimer la MA. A cela s'ajoute un déficit œstrogénique observé à la ménopause qui serait responsable d'une augmentation des dépôts amyloïdes. (Scheyer et al., 2018). De plus durant la première partie du XX^{ème} siècle, en raison d'un niveau d'éducation plus faible que celui des hommes, les femmes étaient considérées plus vulnérables face à la MA. La MA est divisée en deux catégories : les formes familiales ou génétiques, qui sont extrêmement rares (moins de 1 % des cas) et les formes sporadiques représentant environ 99 % des cas (**figure 10**).

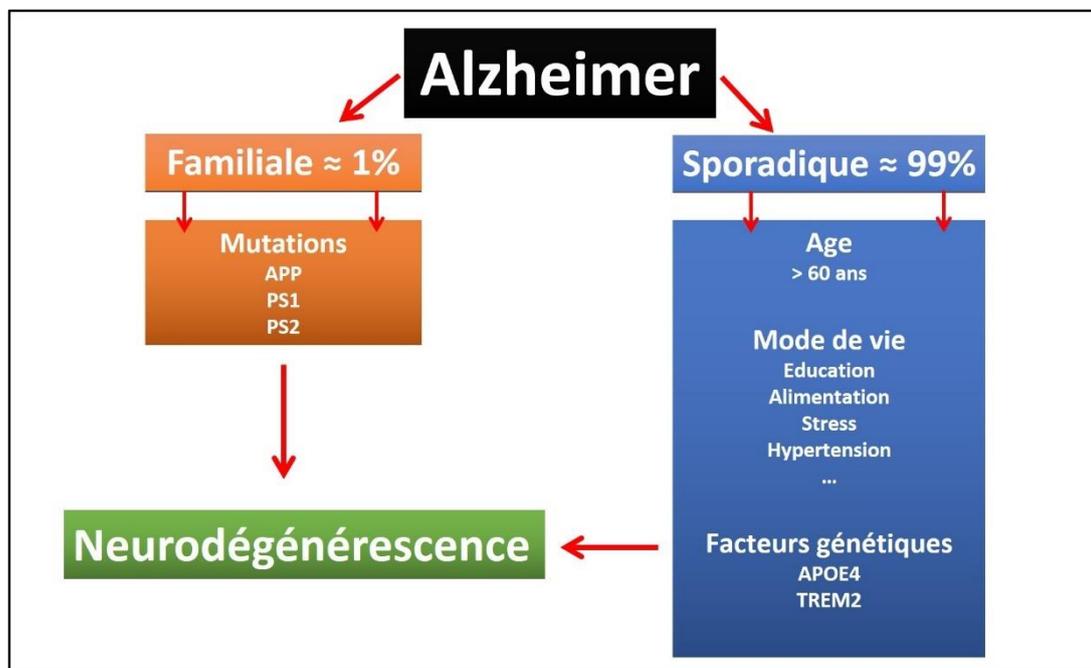


Figure 10 : Causes et facteurs de risque des deux formes de la MA

La première, familiale, est due à des mutations de gènes codant pour des protéines ayant la particularité d'intervenir à différents niveaux de la cascade amyloïde. Ces mutations, dont la pénétrance est dite « complète », sont causales car dans les familles concernées, la présence de la mutation transmise par un des parents entraîne inmanquablement le développement de la maladie chez l'enfant qui en est porteur. Les formes sporadiques, quant à elles, peuvent être favorisées ou au contraire partiellement prévenues par de nombreux autres facteurs notamment environnementaux (**figure 10**).

1.4.1 Les formes familiales ou génétiques

Les formes familiales de la MA résultent de mutations de plusieurs gènes (**figure 10**).

Rappelons que c'est le docteur Alois Alzheimer qui identifia en premier la forme génétique de la maladie au début du XX^{ème} siècle. En effet, sa patiente Auguste Deter, était touchée par une forme familiale de la maladie, caractérisée par une mutation du gène *PSEN1* (Müller et al., 2013), localisé sur le chromosome 14 et codant pour la protéine préséniline 1 (PS1). Les mutations associées à ce gène sont les plus fréquentes dans les formes précoces de la MA (Ringman et al., 2014). La PS1 forme le noyau catalytique du complexe enzymatique de la γ -sécrétase, constitué d'au moins 3 autres protéines (Farmery et al., 2003) : Aph-1 (Anterior pharynx defective 1 homolog), Pen-2 (Presenilin enhancer 2) et la nicastrine (NCT) (**figure 11**).

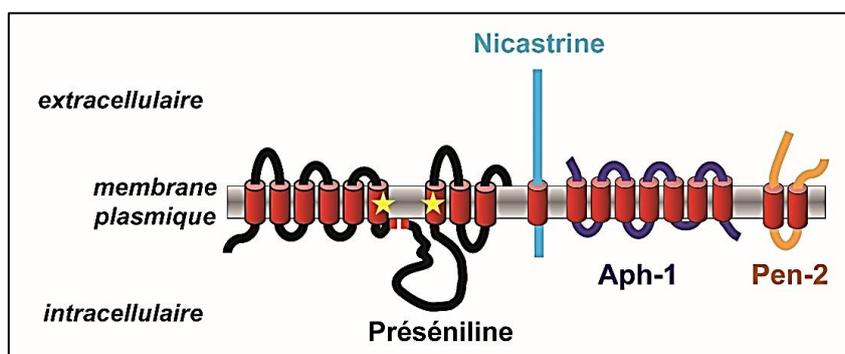


Figure 11 : La préséniline dans le complexe de la γ -sécrétase

D'après (Walter, 2015)

Cette enzyme, associée notamment à la cascade amyloïde est un élément clé dans la production du peptide amyloïde. Les mutations du gène *PSEN1* augmentent ainsi l'activité catalytique du complexe et donc la quantité d'A β générée (Jiang et al., 2018 ; Scheuner et al., 1996). Plus d'une centaine de mutations ont été décrites sur le gène *PSEN1*, elles sont dominantes et représentent près de 80 % de tous les cas de formes familiales de la MA.

Un autre gène codant pour une protéine ayant la particularité d'intervenir au niveau de la cascade amyloïde présente également des mutations génétiques. Il s'agit du gène *PSEN2* localisé sur le chromosome 1 et codant pour la préséniline 2 (PS2). La protéine PS2 possède 67 % d'homologie avec la PS1 et est aussi impliquée dans la production du peptide amyloïde (Jiang et al., 2018 ; Steiner et al., 1999). Cependant, la PS2, exprimée plus tardivement que la PS1 au cours du développement embryonnaire murin (Lee et al., 1996) est peu exprimée dans le cerveau mais l'est surtout dans les tissus périphériques. Actuellement 13 mutations sur le gène *PSEN2* ont été recensées et elles représentent seulement 6 % des cas de MA d'origine génétique. Près de 70 %

d'entre elles ont une pathogénicité avérée alors que pour les autres, des données complémentaires sont encore nécessaires pour garantir leur caractère pathogène.

Enfin, les mutations du gène *APP*, localisé sur le chromosome 21 et codant pour le précurseur APP, ont été mises en évidence pour la première fois en 1991 (Goate et al., 1991). Actuellement, 24 mutations considérées pathogènes sur le gène *APP* ont été répertoriées et concernent environ 9 % des familles touchées par une forme familiale de la MA.

1.4.2 Les formes sporadiques

Les formes sporadiques de la MA ne résultent pas d'une mutation génétique et apparaissent plus tardivement. La fréquence de la MA augmente en raison d'un allongement de l'espérance de vie et d'un vieillissement de la population générale (**figure 10**).

Il peut exister un facteur génétique de susceptibilité, le polymorphisme du gène codant pour l'apolipoprotéine ϵ (ApoE). Cette dernière est une protéine majoritairement synthétisée par les hépatocytes et de façon moindre par les astrocytes. Elle est impliquée dans le transport lipidique, le métabolisme du cholestérol et l'inflammation (Pitas et al., 1987). Cette protéine existe sous différentes isoformes nommées $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$. L'expression de la forme $\epsilon 3$ est la plus fréquente (environ 80 %), tandis que la forme $\epsilon 4$ s'accompagne d'un plus grand risque de développer la MA (Corder et al., 1993 ; Theendakara et al., 2018). En effet, la présence d'un allèle $\epsilon 4$ augmente de 3 à 4 fois la probabilité de développer la maladie alors que l'expression des deux allèles, ce qui concerne environ 1 % de la population générale, l'augmente de 12 fois. Le rôle physiologique de cette protéine dans la MA n'est pas clairement établi mais elle serait impliquée dans la régulation de la transcription du gène *APP* (Lee et al., 2017a). De plus, il a été démontré que les concentrations protéiques de TAU dans le LCR des patients porteurs de cet allèle sont plus élevées (Han et al., 2010). Un autre facteur génétique de susceptibilité concerne le gène *TREM2* localisé sur le chromosome 6. Ce gène code pour une protéine libérée dans l'espace extracellulaire en tant que variant soluble (sTREM2) qui participe à l'activation de la réponse immunitaire dans la microglie. Dans un modèle de souris transgénique de la MA, une augmentation d'expression de *TREM2* a été observée dans la microglie entourant les plaques amyloïdes et les neurones comparativement à des souris sauvages (Raha et al., 2017). Des mutations de ce gène ont été associées à un risque 5 fois plus élevé de développer une MA. En effet, l'analyse du gène *TREM2* par séquençage a permis de montrer un excès de mutations du gène *TREM2* chez des patients atteints de la MA par rapport à des patients témoins (Cheng et al., 2016). De plus, la présence du sTREM2 dans le LCR de patient Alzheimer a été démontrée (Henjum et al., 2016) et a permis

d'envisager cette protéine comme biomarqueur potentiel de l'activation microgliale, retrouvée au cours de la MA, à un stade précoce (Suárez-Calvet et al., 2016).

D'autres facteurs non génétiques sont aussi régulièrement associés à l'apparition de la MA sans qu'aucun lien de causalité n'ait été établi avec certitude (Hersi et al., 2017). Il s'agit des facteurs de risque cardio-vasculaire (hypertension artérielle, diabète, tabagisme, obésité), des facteurs d'expositions environnementales (métaux ou agents physiques et chimiques), des facteurs nutritionnels (excès d'acides gras polyinsaturés $\omega 6$, déficit en vitamine B12) et des accidents cérébraux (traumatismes crâniens répétés). Il est de plus en plus établi que le contrôle des facteurs de risque cardio-vasculaire influe efficacement sur la diminution du risque de développer une démence. En effet, en 2018 une équipe de chercheurs a établi que l'absence d'altérations cardio-vasculaires était associée à un faible risque de démence et à une diminution du déclin cognitif chez des sujets âgés (Samieri et al., 2018). Par ailleurs, le niveau de scolarisation et la nature de l'activité professionnelle sont déterminants dans le risque de développer la maladie. La stimulation cognitive permettra l'établissement et la persistance de connexions synaptiques abondantes qui garantira le retard du déclin cognitif observé dans la MA. Cette observation scientifique est tirée de l'étude mondialement connue « Nun Study » (Snowdon, 2003).

1.5 Le métabolisme de l'APP

Chez l'humain, la protéine APP est codée par un gène situé sur le chromosome 21, identifié pour la première fois en 1987 par plusieurs laboratoires indépendants (Thinakaran and Koo, 2008). Cette protéine existe au moins sous trois isoformes, APP 695, APP 751 et APP 770, résultant d'un épissage alternatif de l'exon 7 et de l'exon 8 (**figure 12**). L'APP 695 est la forme la plus abondante dans le cerveau et est principalement présente dans les neurones (Belyaev et al., 2010), tandis que les deux autres isoformes de l'APP sont principalement présentes dans les cellules gliales, telles que les astrocytes. L'isoforme APP 770 existe également dans les cellules endothéliales vasculaires cérébrales et peut être à l'origine de la libération du peptide A β et par conséquent, conduire à un dépôt d'A β sur les parois vasculaires cérébrales. Ce phénomène est à l'origine de l'angiopathie amyloïde cérébrale retrouvée chez plus de 80 % des patients atteints de la MA (Kitazume et al., 2010). L'APP est composée d'un grand domaine extracellulaire (N-terminal) qui fonctionne comme un motif d'adhérence cellulaire régulant l'interaction et la migration des cellules. Ce domaine constitue environ 88 % de la masse protéique totale. Ces interactions intercellulaires sont importantes dans les premières phases de développement pour la genèse de jonctions synaptiques (Nalivaeva and Turner, 2013 ; Soba et al., 2005).

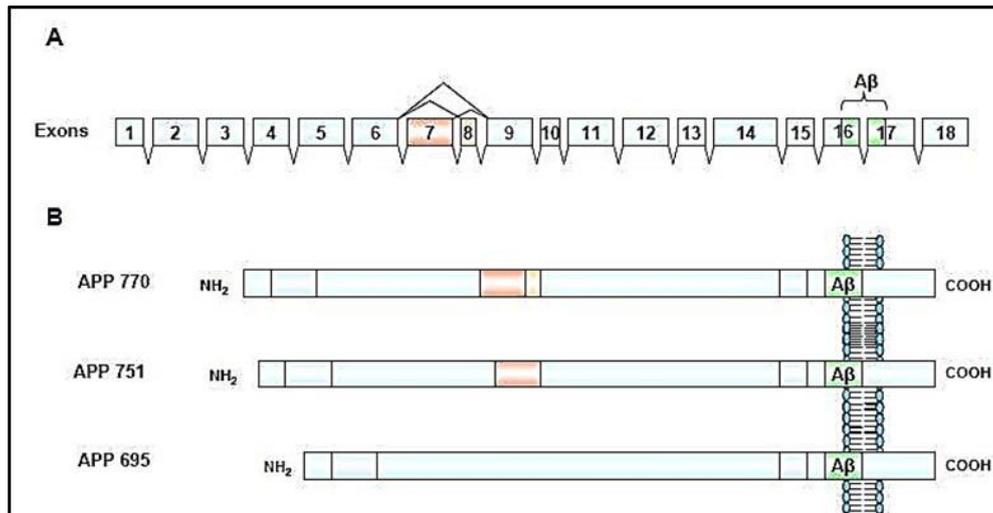


Figure 12 : Structure de l'ARNm et des trois principales isoformes protéiques de l'APP
(Laumet, 2010)

Dans le cerveau, la protéine APP est impliquée dans la migration cellulaire, la synaptogenèse et la plasticité synaptique. Elle joue donc un rôle crucial dans le développement, la maturation du cerveau et le fonctionnement du réseau cérébral (Korte et al., 2012). L'APP peut subir un traitement protéolytique *via* deux voies majeures : la voie non-amyloïdogène, considérée comme la voie physiologique du métabolisme de l'APP ne libérant pas de métabolites toxiques et la voie amyloïdogène, dérégulée dans la MA et qui conduit à la production massive d'Aβ (**figure 13**).

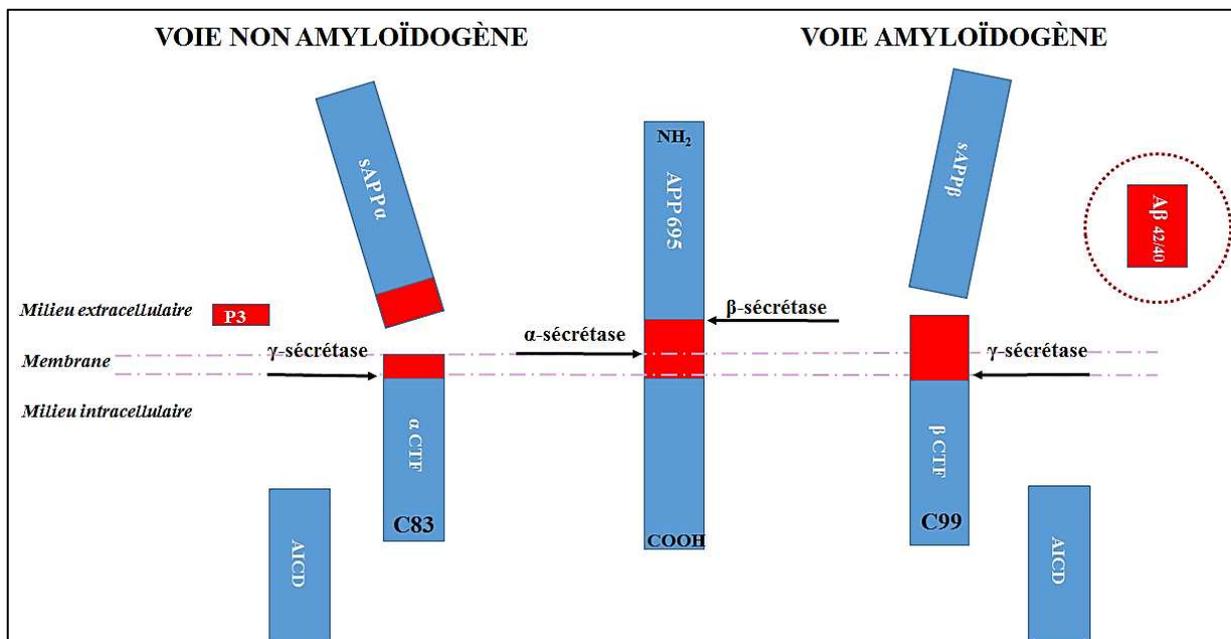


Figure 13 : Représentation schématique des deux voies de catabolisme de la protéine APP
Catabolisme de l'APP par les voies protéolytiques non-amyloïdogène et amyloïdogène

1.5.1 La voie non amyloïdogène

Dans cette voie physiologique, la protéine APP est clivée successivement par 2 enzymes protéolytiques, l' α -sécrétase et la γ -sécrétase. La première fait partie de la famille des métalloendopeptidases également appelées ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease Domain) (Haass et al., 2012). Parmi ces protéases, ADAM10 est considérée comme une protéase clé dans le catabolisme de l'APP car elle permet d'initier le clivage non-amyloïdogène de l'APP (Prox et al., 2013). Ce clivage donne naissance à un large fragment soluble, sAPP α , relargué dans le milieu extracellulaire et un autre fragment membranaire, le peptide C83 ou α -CTF (C-Terminal Fragment). Ce dernier fragment est dans un second temps clivé par la γ -sécrétase, qui mène à la production du peptide P3 dans le milieu extracellulaire et le domaine intracellulaire AICD (APP Intra Cellular Domain) rapidement dégradé dans le milieu intracellulaire. Parmi les substrats de la γ -sécrétase, le récepteur NOTCH est particulièrement important. En effet, cette protéine est essentielle au développement embryonnaire et sa déplétion conduit à des désordres importants qui sont létaux au cours de l'embryogenèse (Conlon et al., 1995). Chez les personnes ne souffrant pas de la MA, la voie non-amyloïdogène clive près de 90 % de l'APP mature, les 10 % restants étant catabolisés par la voie amyloïdogène (Ahmed et al., 2010). La proportion relative de ces deux voies cataboliques est inversée dans la MA.

1.5.2 La voie amyloïdogène

Dans cette voie physiologique, l'APP va dans un premier temps être clivé par la β -sécrétase (BACE1 (Beta-site APP cleaving enzyme 1)) donnant naissance à un fragment soluble sAPP β et un autre fragment membranaire β -CTF ou aussi appelé C99. Le site de clivage de l'APP par la β -sécrétase a été identifié en 1999 et actuellement, aucune mutation directement impliquée dans le développement de la MA n'a pu être identifiée sur le gène codant pour cette enzyme (Moussa, 2017). Bien que dans des conditions non pathologiques, BACE1 soit présent presque exclusivement dans les neurones, une augmentation des taux de BACE1 a été rapportée dans les astrocytes de patients souffrant de la MA (Hartlage-Rübsamen et al., 2003 ; Rossner et al., 2005). Par ailleurs, dans le cerveau des patients atteints de la MA, les taux de BACE1 sont nettement plus élevés dans 50 % des cas. Une augmentation des taux de BACE1 a également été démontrée dans des modèles murins de la maladie (Haass et al., 1995 ; Luo et al., 2016). Une augmentation anormale de la concentration de BACE1 dans le LCR pourrait donc être un biomarqueur précoce de la MA (Evin et al., 2010 ; Fukumoto et al., 2002). C'est dans un deuxième temps que ce fragment membranaire C99 est à son tour clivé par la γ -sécrétase qui libère le domaine

intracellulaire AICD et le peptide A β . Deux formes majoritaires du peptide A β de 37 à 43 acides aminés sont produites par ce clivage de la γ -sécrétase : l'A β ₁₋₄₀ (comportant 40 acides aminés) dont la production est majoritaire (environ 80 %) et l'A β ₁₋₄₂ (comportant 42 acides aminés), qui s'agrège plus facilement (Takahashi et al., 2017). C'est l'agrégation de ces peptides A β dans le milieu extracellulaire qui est à l'origine de la formation des plaques amyloïdes (O'Brien and Wong, 2011).

1.5.3 La cascade amyloïde

C'est en 1992 que John Hardy et Gerald Higgins ont proposé l'hypothèse de la cascade amyloïde comme origine de la MA (Hardy and Higgins, 1992). Cette hypothèse met en son centre le peptide A β comme initiateur de la cascade pathologique survenant dans la MA (Hardy and Allsop, 1991). Dans cette étude, John Hardy et son équipe ont découvert que certains cas de formes familiales de MA sont provoqués par des mutations présentes sur le gène *APP* et conduisent à une production accrue de l'A β ₁₋₄₂. Par ailleurs, les individus porteurs d'une trisomie 21 et ayant donc une copie supplémentaire partielle ou non du gène *APP*, ont une probabilité plus élevée de développer une MA autour de 50 / 60 ans. Une production trop importante du peptide A β serait donc à l'origine du développement de la pathologie chez ces patients (Reiss et al., 2018 ; Selkoe, 1991). Dans les formes sporadiques de la MA, ce ne sont pas des mutations qui déclenchent la survenue de la pathologie, mais là aussi, l'augmentation d'A β ₁₋₄₂. Cet élément unifie donc les deux formes possibles de la maladie, conduisant à l'hypothèse du peptide A β toxique qui, sous forme de fibrilles, cause des défauts synaptiques et homéostasiques dans les cellules. L'agrégation de l'A β en plaques amyloïdes va ensuite causer l'activation des cellules gliales ainsi qu'une réponse inflammatoire délétère dans le cerveau. Cette cascade mène *in fine* à la formation de DNFs dans les neurones suite à la dérégulation synaptique observée dans le phénomène d'excitotoxicité glutamatergique lié à la MA (**figure 14**).

En effet, il a été mis en évidence que des mutations du gène *TAU* pouvaient être à l'origine de démences, mais il s'agit alors de démences fronto-temporales, avec la présence d'agrégats de cette protéine mais une absence de plaques amyloïdes. Les DNFs apparaîtraient donc suite aux lésions amyloïdes (Bloom, 2014 ; Hardy et al., 1998).

Cependant cette hypothèse amyloïde, longtemps considérée comme le paradigme dominant de la recherche sur la MA, a montré au fil des années quelques limites et est encore à ce jour débattue au sein de la communauté scientifique (Ricciarelli and Fedele, 2017). Dans une étude de 1991, des DNFs ont été observées dans le cerveau au cours du vieillissement normal dans la partie interne

du lobe temporal (Hauw et al., 1991). A 50 ans, près de la moitié des sujets normaux avaient déjà des DNFs au sein du cortex temporal. Ces sujets n'avaient pas de troubles cognitifs quand ils sont décédés et rien ne permet de savoir s'ils auraient développé la MA plus tard. La MA débute-t-elle donc par une généralisation des modifications de la protéine TAU au sein des neurones ou par l'apparition des plaques amyloïdes au sein du cortex cérébral ? L'hypothèse aujourd'hui retenue serait une interaction entre les deux phénomènes. L'apparition des plaques amyloïdes dans le cortex cérébral serait l'élément déclencheur qui aurait pour effet d'activer la pathologie TAU et d'entraîner son explosion en dehors des régions temporales internes et donc à l'origine de l'apparition des symptômes de la MA.

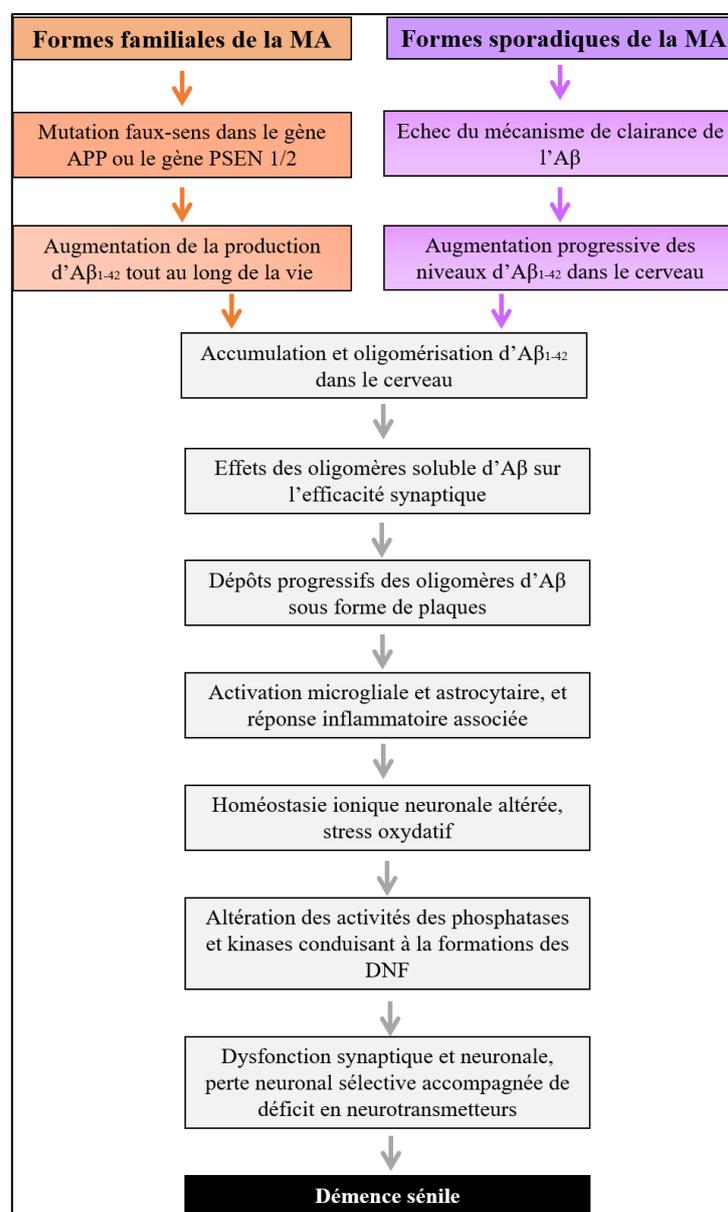


Figure 14 : Version actuelle de la cascade amyloïde
D'après (Selkoe and Hardy, 2016)

1.6 La clairance de l'A β

Des systèmes de dégradation de l'A β existent, certains faisant intervenir des mécanismes de transport vers la circulation sanguine, d'autres des enzymes telles que des protéases exprimées par les neurones, les cellules gliales et les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, comme la neprilysine (NEP) et l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE).

1.6.1 La dégradation enzymatique de l'A β

Une première protéine transmembranaire de 97 kDa, la NEP, une métalloprotéase dépendante du zinc, a son expression diminuée au cours du vieillissement normal et pathologique dans les zones atteintes par la MA, telles que l'hippocampe. Cette baisse qui peut atteindre 50 % est corrélée à l'augmentation des plaques amyloïdes dans la MA (Yasojima et al., 2001a, 2001b). Cette diminution d'expression pourrait être une hypothèse pour expliquer l'augmentation des A β et donc l'induction des troubles cognitifs observés dans la MA. En effet, des souris dont le gène codant pour la NEP a été invalidé présentent une augmentation des dépôts d'A β_{1-40} et d'A β_{1-42} (Iwata et al., 2001). A l'inverse, la surexpression de NEP dans le cerveau de souris Tg2576 conduit à une diminution des dépôts amyloïdes (Iwata et al., 2004). Cette enzyme régule donc le développement des plaques amyloïdes. L'amplification de l'activité de la NEP constitue donc une piste de traitement (Sharma et al., 2019).

Une deuxième enzyme, l'IDE appelée également insulinasé, dégraderait les fibrilles et les plaques amyloïdes. Comme pour la NEP, l'expression de l'IDE diminue au cours du vieillissement normal et pathologique et son expression est inversement corrélée au nombre de plaques amyloïdes dans la MA (Caccamo et al., 2005) ce qui en fait aussi une cible possible pour le traitement de cette maladie (Kurochkin et al., 2018).

1.6.1 La clairance de l'A β au niveau de la BHE

Selon certains chercheurs, une diminution de la clairance de l'A β dans le cerveau serait la cause principale de l'accumulation de ce peptide dans les formes sporadiques de la MA. Ceci les a conduits à émettre l'hypothèse d'un mécanisme d'élimination par transport vasculaire altéré au niveau de la BHE (Cai et al., 2018).

Le récepteur LRP1 (Low density lipoprotein receptor-Related Protein 1) est impliqué dans le transport et le métabolisme des lipoprotéines associées au cholestérol et à l'ApoE et est exprimé dans les neurones, les astrocytes, les péricytes et les cellules endothéliales de la BHE. Il peut transporter différents ligands par transcytose à travers la BHE, comme le peptide A β (Deane et al.,

2004). Cependant, LRP1 est exprimé en quantité plus faible chez des souris âgées, ce qui pourrait expliquer la diminution de la clairance de l'A β dans la MA (Shibata et al., 2000). Le récepteur LRP1 joue également un rôle dans la clairance plasmatique. Dans le plasma humain, la protéine majoritairement liée à l'A β circulant est la forme soluble du récepteur (sLRP1) produite dans le foie. En condition physiologique normale, sLRP1 lie 70 à 90 % d'A β soluble (Sagare et al., 2012). Mais, dans des conditions pathologiques, telles que la MA, ce complexe sLRP1 - A β est largement diminué en raison d'une oxydation de sLRP1 dans le plasma, ce qui engendre une diminution de la clairance d'A β hépatique et donc une augmentation d'A β dans le cerveau (Sagare et al., 2012).

La P-gp (Permeability-GlycoProtein), pompe d'efflux participant à la protection et à la détoxification du SNC serait capable également de transporter l'A β à travers la BHE, contribuant à l'élimination de ce peptide et donc son accumulation au niveau du parenchyme cérébral. Chez des souris Tg2576, en présence d'inhibiteurs de P-gp, une diminution de l'élimination d'A β et par conséquent, une augmentation des dépôts amyloïdes, est observée (Cirrito et al., 2005). De plus, les dépôts d'A β ₁₋₄₀ et d'A β ₁₋₄₂ sont inversement corrélés à l'expression de la P-gp au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux chez des sujets âgés non déments (Vogelgesang et al., 2002). La P-gp pourrait donc jouer un rôle dans la formation des plaques amyloïdes.

Un troisième acteur de la BHE pourrait influencer la clairance de l'A β , il s'agit du récepteur RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products). Ce récepteur est une glycoprotéine considérée comme le principal récepteur d'influx du peptide A β . Il est faiblement exprimé dans des conditions physiologiques (Sagare et al., 2007) mais chez des patients atteints de la MA et des souris Tg2576, ce récepteur est surexprimé au niveau des capillaires cérébraux et des microvaisseaux (Deane et al., 2003 ; Donahue et al., 2006), favorisant ainsi l'entrée d'A β dans le cerveau. L'interaction A β -RAGE peut alors entraîner une série de modifications au niveau de l'endothélium cérébral et notamment une neuroinflammation (Fang et al., 2010).

Un dysfonctionnement des transporteurs d'efflux et d'influx de la BHE pourrait donc contribuer à la pathogenèse de certains troubles neuronaux dégénératifs retrouvés dans la MA (Montagne et al., 2017 ; Ueno et al., 2010) (**figure 15**).

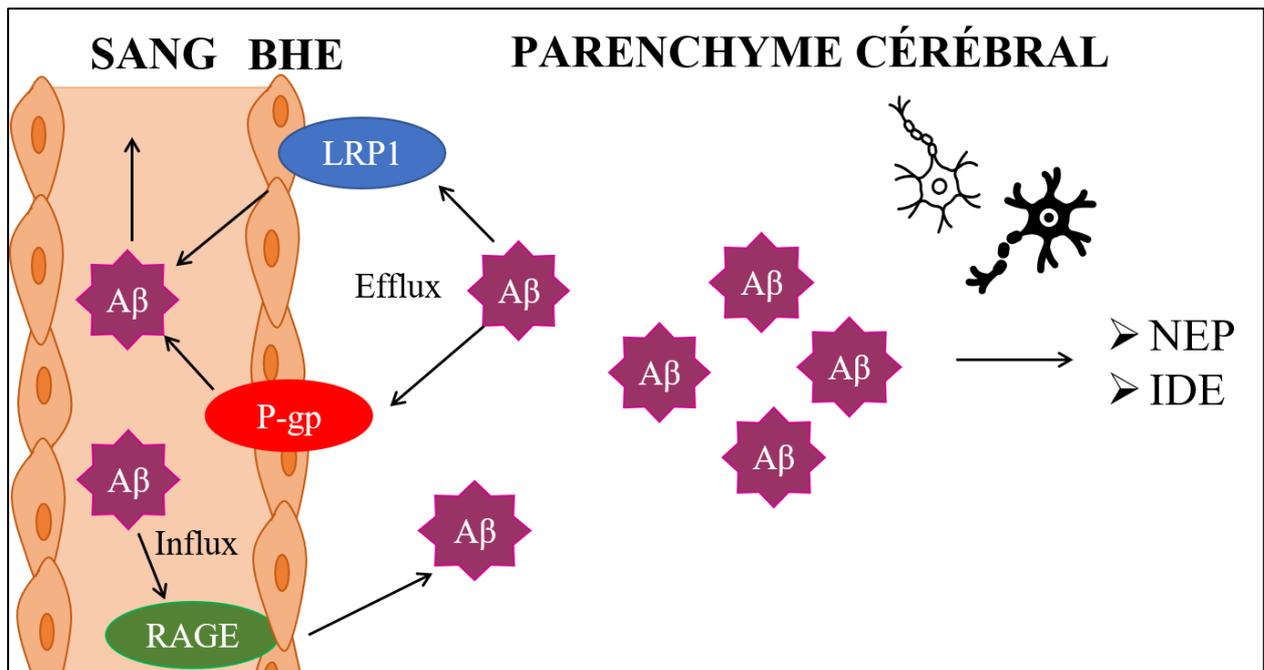


Figure 15: Clairance de l'Aβ

*Dégradation enzymatique par des protéases
Clairance au niveau de la BHE*

1.7 Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer

Le diagnostic de « certitude » de la MA n'est aujourd'hui possible qu'après examen anatomopathologique *post-mortem*. Ce diagnostic peut être cependant proposé à différents stades de l'évolution de la maladie et dépend du moment où le patient vient consulter pour la première fois. Jusqu'aux début des années 2010, il n'était possible de poser un diagnostic fiable qu'aux stades avancés de la maladie, lorsque le patient avait déjà perdu son autonomie quotidienne (stade démentiel). De plus en plus, les outils mis à la disposition des cliniciens et des chercheurs complètent le tableau clinique et orientent de façon précoce le diagnostic. Ainsi, le diagnostic de la MA repose aujourd'hui sur des approches pluridisciplinaires telles que la neurologie, la neuroimagerie, la neuropsychologie et les neurosciences. Les moyens d'investigation mis à contribution pour cette maladie se sont considérablement développés au cours des 30 dernières années avec notamment le développement de la neuroimagerie et de marqueurs biologiques *in vivo*.

Parmi ces moyens de diagnostic, les tests cognitifs (de mémoire ou de langage), de plus en plus spécifiques et ciblés, permettent dans un premier temps de positionner le patient sur une échelle de gravité ou d'évolution de la maladie. Il s'agit d'un bilan neuropsychologique réalisé à l'aide de différents tests tels que le rappel d'une liste de mots (test RL/RI16) (Van der Linden et al., 2004),

l'épreuve des cinq mots (Dubois et al., 2002) ou encore un test de reconnaissance visuelle (test DMS 48) (Rullier et al., 2014).

Dans un deuxième temps, des examens médicaux d'une grande précision sont utilisés, comme les électroencéphalogrammes (EEGs) de haute résolution permettant d'étudier la connectivité entre les différentes régions du cerveau et l'imagerie cérébrale morphologique qui doit systématiquement être réalisée en cas de suspicion de MA. L'IRM (imagerie par résonance magnétique) permet ainsi de préciser l'importance et la localisation de l'atrophie. Elle permet également de mieux évaluer la composante vasculaire des troubles cognitifs. L'utilisation d'une imagerie métabolique, quant à elle, est réservée aux patients jeunes ou aux formes atypiques de la MA. En analysant la consommation de glucose, la tomographie par émission de positon (TEP) permet d'apprécier le métabolisme neuronal et ainsi d'étudier les modifications fonctionnelles. Le profil spécifique d'une MA débutante est associé à un hypométabolisme temporo-pariétal et cingulaire postérieur, puis la maladie s'étend au cortex associatif et au lobe frontal (Del Sole et al., 2008).

Une troisième étape non nécessaire dans la pratique courante peut être réalisée. Il s'agit de la recherche de biomarqueurs spécifique de la MA. Dans ce cas précis la haute autorité de santé (HAS) conseille de n'y avoir recours qu'en cas très particulier, lorsque notamment le diagnostic n'est pas formel. L'analyse du LCR permet notamment de doser la protéine TAU, la protéine $T^{481}P$ -TAU (TAU phosphorylée sur la thréonine 481), les peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$.

Le fait de pouvoir diagnostiquer la MA de façon la plus précoce et la plus fiable possible présente plusieurs intérêts dont notamment une prise en charge pluridisciplinaire adaptée et un suivi régulier, dans le but de ralentir la progression de la maladie. Il est donc pour cela nécessaire d'établir des critères de diagnostic sur lesquels se baser pour pouvoir détecter les signes cliniques d'une MA dès les premiers stades. Ainsi, le développement de la neuroimagerie et la recherche de marqueurs biologiques a permis d'établir des critères de diagnostic précoces, combinant les marqueurs cliniques, biologiques et d'imagerie. En 2014, Dubois et ses collaborateurs ont proposé une révision des critères de diagnostic de la MA par rapport à la version initiale de l'IWG (International Working Group) de 2007. (Dubois et al., 2014) (**table 1**).

A Phénotype clinique spécifique

Présence d'une altération de la mémoire épisodique précoce et significative (isolée ou associée à d'autres changements cognitifs ou comportementaux qui suggèrent de légers troubles cognitifs ou un syndrome de démence) qui comprend les éléments suivants :

- Changement progressif et graduel de la mémoire, signalé par le patient ou l'informateur sur plus de 6 mois
- Preuve objective d'un syndrome amnésique de type hippocampique, basée sur des performances significativement altérées lors d'un test de mémoire épisodique

B Preuve *in vivo* de la pathologie d'Alzheimer (l'une des suivantes)

- Diminution de l'A β avec augmentation de TAU ou P-TAU dans le LCR
- Rétention accrue du traceur sur le PET amyloïde
- Présence d'une mutation autosomique dominante (*PSEN1*, *PSEN2* ou *APP*)

Critères d'exclusion pour la MA typique

Histoire

- Apparition soudaine
- Apparition précoce des symptômes suivants : troubles de la marche, convulsions, changements de comportement

Caractéristiques cliniques

- Caractéristiques neurologiques focales
- Signes extrapyramidaux précoces
- Hallucinations précoces
- Fluctuations cognitives

Autres conditions médicales suffisamment graves pour expliquer les troubles de la mémoire et les symptômes associés

- Démence non AD
- Dépression majeure
- Maladie cérébrovasculaire
- Troubles toxiques, inflammatoires et métaboliques
- Modifications du signal IRM FLAIR ou T2 dans le lobe temporal médian

Table 1 : Critères pour le diagnostic de la MA (A plus B à tout stade)

D'après (Dubois et al., 2014)

Ainsi, le diagnostic de la MA typique peut être effectué lors de la présence d'un syndrome amnésique de l'hippocampe, associé à divers troubles cognitifs ou changements de comportement, avec au moins une modification d'un des 2 items suivants :

- Une diminution des niveaux d'A β et une augmentation des concentrations de TAU ou de P-TAU dans le LCR
- La présence significative du traceur de la protéine amyloïde visible par TEP scan.

Bien que les principaux biomarqueurs de la MA actuellement évalués dans le LCR reflètent les mécanismes pathogènes centraux de la maladie, de nouveaux biomarqueurs sont constamment examinés. Ainsi, par exemple des biomarqueurs de la fonction synaptique sont recherchés afin de mettre en avant le changement et la physiopathologie du dysfonctionnement synaptique retrouvés dans la MA (Blennow and Zetterberg, 2018).

1.8 Les traitements de la MA

Bien que des essais cliniques prometteurs soient en cours, aucun traitement curatif de la MA n'est actuellement disponible sur le marché. Cependant, quatre molécules disponibles aujourd'hui ont été découvertes, permettant ainsi un sensible ralentissement de la progression de la MA. Il est important de préciser qu'elles n'empêchent en aucun cas la dégénérescence et la mort neuronale. Trois d'entre elles sont des anticholinestérasiques et permettent de contrecarrer la baisse d'acétylcholine : l'Aricept[®] (donepezil), le Reminyl[®] (galantamine) et l'Exelon[®] (rivastigmine). Le 4^{ème} est l'Ebixa[®] (mémantine) qui est un antagoniste des récepteurs NMDA du glutamate.

1.8.1 Les inhibiteurs de l'acétylcholine estérase

A la fin des années 70, la découverte de la cause de la maladie de Parkinson (MP), à savoir la disparition des neurones dopaminergiques, fut un événement décisif pour la recherche puisqu'une corrélation entre déficit en neurotransmetteurs et maladie neurodégénérative fut ainsi établie (Goetz, 2011). A partir de ce moment-là, les chercheurs se sont focalisés sur les neurotransmetteurs pour chercher une explication à la MA. L'hypothèse cholinergique s'est imposée, l'acétylcholine étant considérée comme le neurotransmetteur de la mémoire. Deux chercheurs américains démontrèrent en 1974 que l'administration chez l'Homme d'un antagoniste de l'acétylcholine entraînait des troubles cognitifs assez similaires à ceux que l'on peut observer chez les sujets âgés et au cours de la MA (Drachman and Leavitt, 1974). L'acétylcholine pourrait donc être pour la MA ce que la dopamine est pour la MP. Cependant, à la différence de la MP, les lésions observées

dans la MA sont extrêmement diffuses et touchent plusieurs populations de neurones notamment dans le cortex, l'hippocampe et les régions sous corticales. Un premier essai clinique évaluant l'effet d'un inhibiteur de l'acétylcholine estérase sur plus de 460 sujets a conduit à une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) par la FDA (Food and Drug Administration) sous le nom de « Tacrine » en 1993. Malheureusement, ce premier médicament fut retiré du marché le 20 avril 2004 suite à des effets secondaires importants et une hépatotoxicité. Ce résultat, certes positif mais très modeste, eut le mérite d'ouvrir la voie à d'autres médicaments de même classe, plus efficaces et mieux tolérés, qui ont vu le jour à la fin des années 90 sous le nom de donepezil, rivastigmine et galantamine. Malheureusement, en raison de leur faible efficacité, la survenue d'effets indésirables parfois graves et un grand risque d'interaction médicamenteuse, ces médicaments ne sont plus remboursés par la sécurité sociale depuis le 1^{er} août 2018, au grand désarroi des patients et de leurs familles.

1.8.2 Les antagonistes des récepteurs NMDA

Un autre médicament s'est aussi vu déremboursé par la HAS. Il s'agit de la mémantine. Le glutamate, neurotransmetteur excitateur et ses récepteurs de type NMDA exercent un rôle déterminant dans l'apprentissage et les processus mnésiques grâce à leur rôle central dans le processus de renforcement synaptique, la LTP. Or dans la MA, l'excès glutamatergique a un rôle délétère, entraînant une excitotoxicité. La mémantine suspend donc ces effets délétères du glutamate à l'origine de la mort neuronale en agissant par blocage des récepteurs NMDA, protégeant ainsi les neurones. L'AMM de la mémantine a été possible grâce à deux études randomisées en double aveugle. La première a été conduite en Suède sur 166 patients institutionnalisés (Winblad and Poritis, 1999) et la seconde étude menée aux États-Unis sur 252 patients en ambulatoire (Reisberg et al., 2003). Ces deux études ont montré une amélioration des signes cliniques, notamment sur le plan cognitif. Ces résultats ont été appuyés par une étude plus récente montrant un effet bénéfique de la mémantine sur la cognition et le comportement chez des patients Alzheimer présentant des formes légères à modérées de la maladie (Peskind et al., 2006).

Cependant, le mode d'action du médicament n'est pas clair (Kishi et al., 2017 ; McShane et al., 2006) et des effets indésirables de la mémantine ont été rapportés, comme des troubles neurologiques (vertiges, maux de tête, somnolence) et vasculaires (hypertension artérielle). Même si ces événements ont été rapportés comme étant peu fréquents et comparables à ceux du placebo, la Ministre de la Santé a interrompu le remboursement de ce médicament, également à partir du

1^{er} aout 2018 (arrêté du 31 mai 2018), suivant l'avis des experts de la HAS qui jugeaient trop modeste son efficacité.

1.8.3 Les autres traitements

Un nombre très important d'essais cliniques sont recensés pour la MA à travers le monde. En effet, selon le site clinicaltrials.gov, 2357 essais ont été réalisés depuis les années 2000 et ce jusqu'à aujourd'hui. 697 essais cliniques relatifs à la MA sont actuellement en cours dans le monde dont plus de deux tiers localisés aux Etats-Unis ou en Europe. Plus de 150 laboratoires sont actuellement concernés par la recherche pharmaceutique sur la MA, avec plus d'une centaine de molécules en développement. Les progrès réalisés dans la compréhension de la MA permettent aujourd'hui d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques. Ces stratégies visent à prévenir l'accumulation d'A β et de ses fragments, ou bien d'agir sur la phosphorylation anormale des protéines TAU en diminuant également leur agrégation en filaments. Malheureusement pendant plus de 15 ans les échecs retentissants des différents essais cliniques ont fini par pousser les chercheurs à remettre en cause leurs hypothèses quant aux causes biologiques de la maladie, incitant des entreprises pharmaceutiques à abandonner la recherche contre Alzheimer.

L'entreprise Biogen a lancé à partir de 2015 deux essais cliniques de phase III (phase précédant une éventuelle commercialisation) en parallèle, nommés EMERGE (1638 patients) et ENGAGE (1647 patients), dans le but d'évaluer l'efficacité de l'aducanumab, un anticorps monoclonal dirigé contre l'A β et présenté comme une molécule ralentissant la progression de MA.

L'aducanumab a ainsi été administré à deux doses différentes (6 et 10 mg/kg), pendant 78 semaines (soit 18 mois) chez des patients présentant un stade précoce de la MA (Sevigny et al., 2016). Le critère principal d'évaluation à la fin de l'étude était le niveau de déclin cognitif et d'autonomie, mesuré par une échelle clinique, la "clinical Dementia Rating Sum of Box" (CDR-SB) qui tient compte à la fois des déficits cognitifs (mémoire, orientation, jugement) et des activités de la vie quotidienne. Cependant, alors que seule une partie des patients avait reçu la totalité du traitement, les effets de l'aducanumab en phase III ont été jugés insuffisants, contraignant le laboratoire Biogen à abandonner ce traitement expérimental en mars 2019.

Toutefois, en octobre 2019, de nouvelles données disponibles ont permis à Biogen de réaliser une nouvelle étude statistique plus large. Cette nouvelle analyse a montré que le critère principal d'EMERGE était statistiquement significatif, ce qui n'a pas été le cas de l'étude ENGAGE. En effet, les patients de la cohorte EMERGE, traités par une forte dose d'aducabumab durant les 18 mois, ont présenté une réduction significative de 23 % du déclin de leur fonction cognitive par

rapport aux patients traités par le placebo. Par ailleurs, l'examen par imagerie cérébrale des cerveaux de ces patients a révélé un recul d'environ 24 % des plaques amyloïdes par rapport groupe placebo.

Pour expliquer l'absence de significativité du critère principal de l'essai ENGAGE, Biogen a expliqué qu'un changement de protocole avait eu lieu en cours de route, ayant pour conséquence une différence de dose d'aducanumab administrée entre les 2 essais cliniques. Les patients inclus dans l'essai clinique ENGAGE avaient ainsi reçu moins d'aducanumab que ceux inclus dans l'essai clinique EMERGE.

Suite à ces nouveaux résultats, Biogen a demandé un enregistrement de ce médicament auprès de la FDA aux USA et la reprise de l'essai clinique, proposé aux patients qui avaient été inclus dans les études initiales arrêtées en mars 2019. Le 28 janvier 2020, la FDA a approuvé cette demande, marquant un tournant scientifique et une nouvelle vague d'espoir.

2 Les polyphénols dans la MA

2.1 Les polyphénols : généralités et classification

Les polyphénols représentent plus de 8000 composés isolés et caractérisés dont les structures sont relativement variées. Ils sont caractérisés par la présence d'au moins deux groupes phénoliques associés en structures plus ou moins complexes, généralement de haut poids moléculaire. (Hümmer and Schreier, 2008).

Ces polyphénols, synthétisés et accumulés par les plantes, participent activement à leur protection contre les microorganismes pathogènes grâce à leur pouvoir antimicrobien et leur capacité de modulation et d'induction des réactions de défense de l'hôte (Clériver et al., 1996 ; A. Sharma et al., 2019). Ils sont également utilisés comme mécanisme de défense par les plantes à la suite de stress exogènes (rayons UV, métaux lourds, l'ozone ...). La synthèse des polyphénols est réalisée grâce à la voie phénylpropanoïde, produisant les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (stilbènes).

Le resvératrol, polyphénol le plus étudié par les chercheurs jusqu'à présent, serait le membre de la famille des stilbènes ayant la plus faible efficacité antifongique. Les plus puissants seraient le ptérostilbène et la viniférine, qui semblent inhiber la croissance du mildiou, un champignon affectant de nombreuses espèces de plantes (Jeandet et al., 2002). L'émergence de l'intérêt du rôle des polyphénols dans la santé est un phénomène qui remonte à plusieurs dizaines d'années. En effet, leurs effets bénéfiques sont aujourd'hui largement étudiés en vue de possibles thérapies pour de multiples pathologies. Les polyphénols sont présents de manière abondante dans la nature, notamment dans les fruits et les légumes (Marranzano et al., 2018). De ce fait, ces molécules font partie de notre alimentation quotidienne et certaines boissons dérivées de ces plantes riches en polyphénols, comme le thé vert ou le vin rouge, sont commercialisées dans le monde entier (Singh et al., 2008). Le régime MIND (Mediterranean-Dash Intervention of Neurodegenerative Delay), à base d'huile d'olive, de fruits oléagineux, de légumes verts, de baies, de légumineuses, de volaille, de poisson et de céréales complètes est ainsi réputé comme jouant un rôle majeur dans la réduction du risque cardio-vasculaire. En effet, ce régime dit « Méditerranéen » est particulièrement intéressant en raison d'observations répétées depuis les années 1980 selon lesquelles les populations des pays du bassin méditerranéen, ont une mortalité par maladies cardio-vasculaires plus faible que celles de populations d'Europe du nord ou des États-Unis, probablement en lien avec leurs habitudes alimentaires respectives (Renaud et al., 1995 ; Salas-Salvadó et al., 2018).

Ces recherches ont aussi permis de mettre en évidence un phénomène mondialement connu sous

le nom de « *French paradox* ». Ce phénomène mis en avant en 1993 par le Pr bordelais Serge Renaud, s'appuie sur une étude épidémiologique révélant une étonnante contradiction entre la richesse en matières grasses de la cuisine française accompagnée d'une consommation de vin et la relativement bonne santé des Français en terme de maladies cardio-vasculaires (Renaud and de Lorgeril, 1993). Les polyphénols contenus dans le vin contribueraient donc à la réduction des risques cardio-vasculaires.

De plus, plusieurs études ont démontré l'implication de certains polyphénols contenus dans le vin rouge, notamment le resvératrol, dans l'atténuation des symptômes de la MA.

Une majorité des observations recueillies à ce jour sur les polyphénols et leurs effet bénéfiques sur la progression de la MA l'ont été par des études *in vitro* ou réalisées sur des modèles animaux (**table 2**), en utilisant des doses plus élevées que celles que nous consommons dans notre alimentation (Scalbert et al., 2005). Depuis ces découvertes, les polyphénols sont donc considérés comme des sources thérapeutiques sérieuses et envisageables contre la MA, ce qui a conduit à des essais cliniques impliquant notamment le resvératrol (Turner et al., 2015) et un cocktail de plusieurs polyphénols (Lee et al., 2017c).

La classification des polyphénols :

Les polyphénols sont divisés en 3 sous-groupes dont les structures chimiques sont différentes : les stilbènes, les acides phénoliques et les flavonoïdes (**figure 16**).

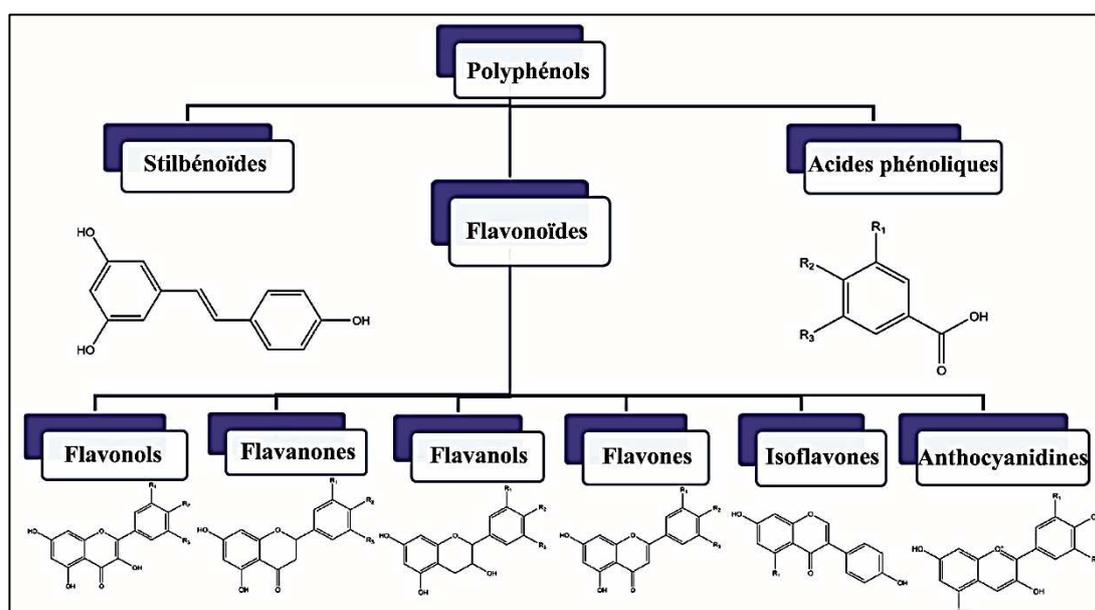


Figure 16 : Classification des polyphénols

Structure chimique des polyphénols (Arora et al., 2019)

<i>Actions</i>	<i>Polyphénols</i>	<i>Modèles</i>	<i>Doses</i>	<i>Références</i>
<i>Inhibition de l'oligomérisation de l'Aβ</i>	Polyphénols extraits de pépins de raisin	Souris Tg2576	200 mg/kg/jour dans l'eau de boisson	(Wang et al., 2008)
<i>Augmentation de la voie non amyloïdogène de l'APP</i>	Polyphénols extraits du vin	Souris Tg2576	6 % Cabernet Sauvignon dans l'eau de boisson	(Wang et al., 2006)
<i>Amélioration de la clairance de l'Aβ</i>	Quercétine – Catéchine - Resvératrol	Cellules HEK293 (APP695)	40 μM	(Marambaud et al., 2005)
<i>Inhibition de la phosphorylation et de l'agrégation de la protéine TAU</i>	Polyphénols extraits de pépins de raisin	Peptide TAU synthétique	22 μM	(Ho et al., 2009)
	Resvératrol	Souris TgPS19	Gavage	(Sun et al., 2019)
<i>Amélioration de la mémoire spatiale</i>	Resvératrol	Souris Tg6799	60 mg/kg/ gavage	(Chen et al., 2019)
	Polyphénols extraits de raisin et myrtilles	Souris C57Bl/6J	500 mg/kg dans l'alimentation	(Bensalem et al., 2018)
	Polyphénols extraits de raisin et myrtilles	Souris C57Bl/6J	500 mg/kg dans l'alimentation	(Bensalem et al., 2016)
<i>Effet anti- inflammatoire</i>	Resvératrol	Cellules microgliales murines BV-2	10 et 50 nM	(Feng and Zhang, 2019)
	Resvératrol	Souris TgAPP/PS1	0,35 % dans l'alimentation	(Capiralla et al., 2012)
<i>Réduction des niveaux d'Aβ₁₋₄₂ et Aβ₁₋₄₀ solubles dans le cortex et l'hippocampe</i>	Miyabénol C	Souris TgAPP/PS1	Injection intracérébroventriculaire 0,60 μg/g	(Hu et al., 2015)
<i>Diminution des dépôts amyloïdes</i>	<i>Trans ε-viniférine</i>	Souris TgAPP/PS1	Injection intrapéritonéale 10 mg/kg	(Caillaud et al., 2019)

Table 2 : Principaux effets bénéfiques in vitro et in vivo des polyphénols dans la MA

2.1.1 Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés non-flavonoïdes présentant une structure carbonée particulière ($C_6-C_2-C_6$), caractérisée par deux cycles benzène reliés par un pont éthylène (**figure 17**).

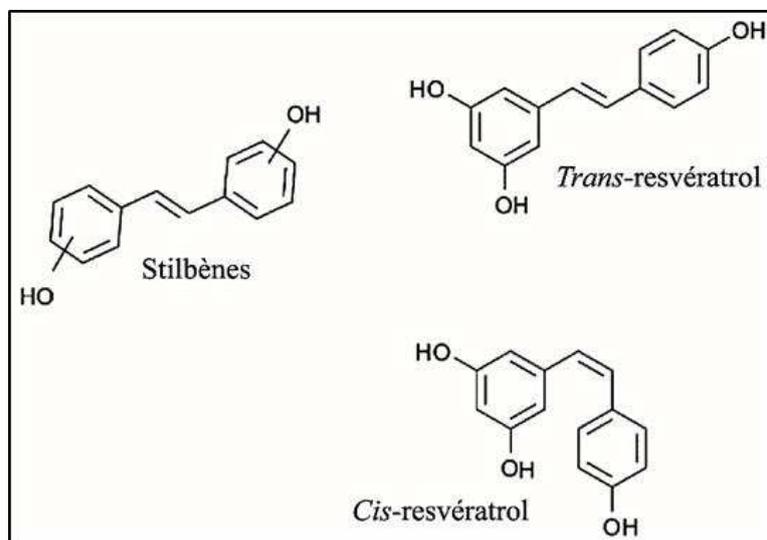


Figure 17 : Structure des stilbènes

Structure générale des stilbènes et exemple du resvératrol

D'après (Singla et al., 2019)

Cette structure de base relativement simple est celle d'un grand nombre de composés comprenant notamment des monomères et des oligomères, mais également des dérivés glycosylés, méthylés, acétylés ... Ces composés ont été identifiés dans de nombreuses familles de plantes et sont également présents dans divers aliments comme le raisin, les fruits rouges, les cacahuètes ou la rhubarbe (Pérez-Jiménez et al., 2010). Le premier stilbène isolé fut le resvératrol (3,5,4'-trihydroxy-stilbene) en 1940 à partir des racines de vérâtre blanc (Takaoka, 1940). Le resvératrol est le stilbène le plus étudié dans le monde (1898 articles référencés dans PubMed le 22-07-20, dont 164 en rapport avec la MA). La vigne et ses dérivés (raisin de table, jus de raisin, vin) constituent la principale source de stilbènes du régime alimentaire occidental. La concentration en stilbènes dans le vin est de l'ordre de 10 mg/L (Stervbo et al., 2007). Le resvératrol, quant à lui, est présent à une concentration pouvant atteindre 2 mg/L dans les différents vins rouges (Burns et al., 2002). Le fort potentiel antioxydant du resvératrol est depuis longtemps associé aux effets bénéfiques d'une consommation modérée de vin sur la santé dans le cas des maladies cardio-vasculaires (Dyck et al., 2019 ; Zordoky et al., 2015).

2.1.2 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés non-flavonoïdes possédant un cycle phénolique lié à un groupement carboxyle (**figure 18**). Les acides phénoliques les plus courants ne sont pas présents à l'état libre dans la nature mais, ayant tendance à former des esters avec le glucose, l'acide tartrique ou l'acide quinique, ils sont retrouvés dans certains aliments comme le café, les myrtilles, les kiwis, les prunes et les pommes (Justesen et al., 1998).

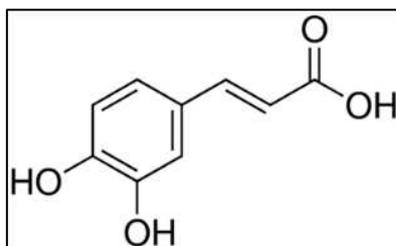


Figure 18 : Structure chimique de l'acide caféique

(Wang et al., 2016)

Il existe principalement deux formes d'acides phénoliques : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique, qui après méthylation, peuvent former entre autres l'acide gallique, l'acide salicylique, l'acide caféique et l'acide férulique.

Les acides phénoliques sont des composés qui ont des propriétés antioxydantes et peuvent contribuer à prévenir l'apparition de plusieurs maladies (cancers, maladies cardio-vasculaires et maladies liées au vieillissement) en neutralisant les radicaux libres de l'organisme (Van Hung, 2016 ; Wang et al., 2016).

2.1.3 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent la catégorie la plus abondante de la famille des polyphénols, comprenant près de 5000 molécules avec une grande diversité structurale. Les flavonoïdes sont répertoriés en 6 catégories : les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavanones, les flavanols et les anthocyanes (Arora et al., 2019).

Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété de végétaux retrouvés dans notre alimentation comme les oignons, le thé vert, le chocolat, le citron, le raisin (Peterson and Dwyer, 1998). Ces polyphénols ont un squelette carboné commun de type phénylbenzopyrane composé de 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), dont les composants en C6 sont des noyaux aromatiques et en C3 des noyaux hétérocycliques (**figure 19**).

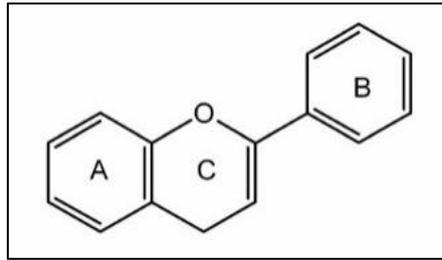


Figure 19 : Structure des flavonoïdes

A, B : Noyaux aromatiques ; C : Noyau hétérocyclique

(Aron and Kennedy, 2008)

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les flavonoïdes possèdent des activités anti-inflammatoires, antioxydantes, antiallergiques, antivirales et anticarcinogènes (Maleki et al., 2019 ; Middleton et al., 2000 ; Parhiz et al., 2015). Il n'est donc pas surprenant que certaines plantes et épices contenant des flavonoïdes soient utilisées depuis des milliers d'années dans la médecine traditionnelle orientale. Nous pouvons citer à titre d'exemple le gallate d'épigallocatechine (EGCG) contenu dans le thé vert et connu pour ses puissantes propriétés antioxydantes (Dietz and Dekker, 2017). Cette molécule a par ailleurs fait l'objet d'études cliniques menées chez des patients adultes atteints d'obésité et de sclérose en plaque (Mähler et al., 2015 ; Mielgo-Ayuso et al., 2014). La quercétine, un autre polyphénol contenu notamment dans les oignons a lui aussi été beaucoup étudié comme agent thérapeutique potentiel (Javadi et al., 2017 ; Rezvan et al., 2017). Une meilleure connaissance des propriétés des flavonoïdes, par exemple anticancéreuses, anti-inflammatoires ou antiallergiques (Ghedira, 2005), pourrait influencer nos habitudes alimentaires dans le but de prévenir certaines pathologies.

2.2 Les propriétés antioxydantes des polyphénols

2.2.1 La formations des espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène (ou dioxygène, O₂) est essentiel à la production d'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) pour les organismes multicellulaires aérobies. Cette production se fait par l'intermédiaire de l'ATP synthase dans la mitochondrie grâce au fonctionnement d'une chaîne de transporteurs d'électrons dont l'accepteur final est le dioxygène. Cependant les cellules convertissent une faible partie de l'O₂ en métabolites potentiellement toxiques, les espèces réactives de l'oxygène (EROs) qui sont susceptibles de participer à la dégradation de biomolécules telles que les lipides, les protéines ou l'ADN (Dickinson and Chang, 2011 ; Favier, 2003). Ce phénomène est appelé stress oxydant. Ainsi, environ 2 % de l'oxygène consommé au niveau

mitochondrial est transformé en radicaux superoxydes $O_2^{\cdot-}$. Parmi ces radicaux, on retrouve des formes réduites de l' O_2 tel que le radical hydroxyl (OH^{\cdot}), les radicaux oxyl (RO^{\cdot}) et peroxy (ROO^{\cdot}), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le dioxygène singulet (1O_2), l'acide hypochloreux ($HClO$), l'ozone (O_3) et le peroxyde d'azote ($ONOO^-$) (Aron and Kennedy, 2008 ; Dickinson and Chang, 2011). Ces EROs présentent différentes réactivités qui peuvent être délétères pour la cellule, comme l'oxydation de protéines et de l'ADN, l'oxydation des acides gras polyinsaturés ou l'activation de kinases (Favier, 2003) (**figure 20**).

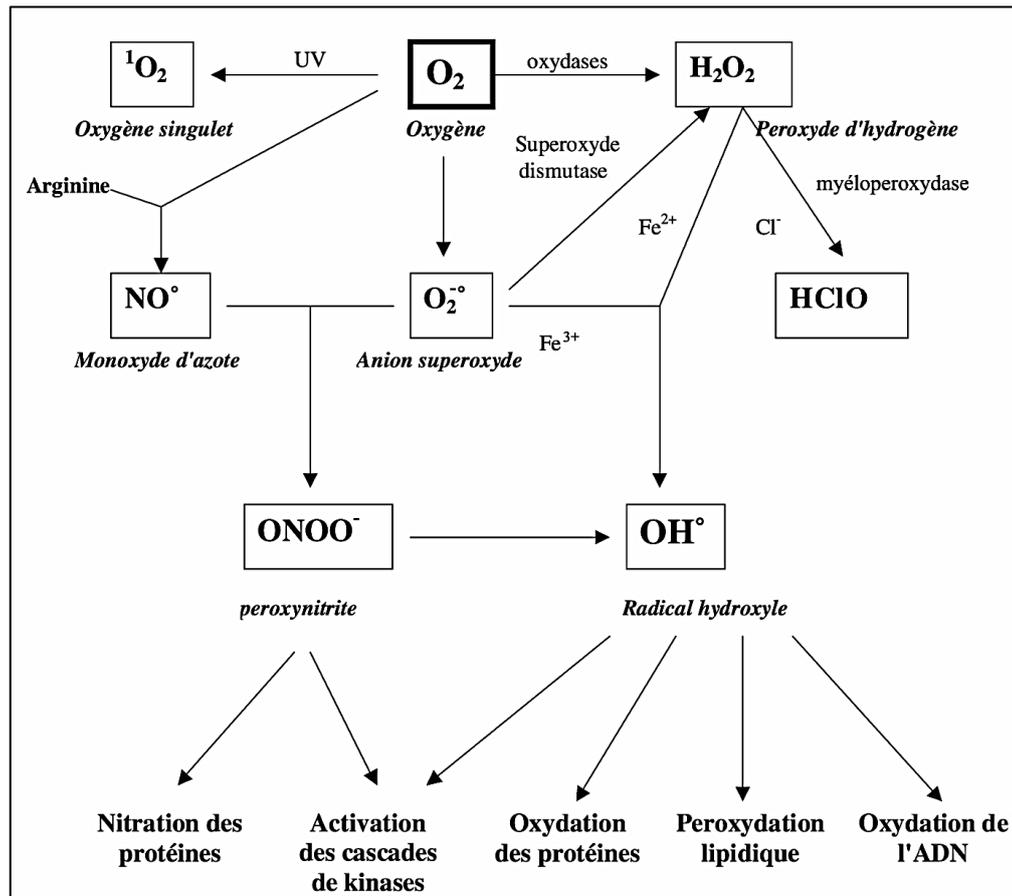


Figure 20 : Origine des radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène
D'après (Favier, 2003)

Fort heureusement, des enzymes antioxydantes, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase ou la glutathion peroxydase, sont présentes au sein de notre organisme afin de prévenir et de freiner l'action de ces EROs (Glorieux and Calderon, 2017 ; He et al., 2017). De plus, certaines vitamines, comme les vitamines C ou E d'origine essentiellement alimentaire, ou le glutathion participent également à la défense antioxydante.

Les EROs sont également générées sous l'effet d'oxydants environnementaux comme les rayonnements (UV, X), lors de la consommation excessive d'alcool, en cas de tabagisme ou lors

d'exercice physique intense. Mais leur production peut aussi être augmentée en cas d'anomalies génétiques conduisant à une réduction de l'efficacité des enzymes naturelles antioxydantes. Par exemple, les niveaux de la SOD fonctionnelle, qui dépendent du contrôle transcriptionnel, de la régulation épigénétique et des modifications post-transcriptionnelles, peuvent être altérés par des mutations entraînant une activité déficiente de la SOD (Hernandez-Saavedra and McCord, 2003) et une modification de sa structure (Borgstahl et al., 1996).

Cependant, les antioxydants d'origine alimentaire contribuant à la défense de l'organisme contre le stress oxydant et ses conséquences, en agissant en complément de nos défenses naturelles, pourraient jouer un rôle protecteur important dans la MA (Dangles, 2012 ; Hussain et al., 2016).

2.2.2 Le stress oxydant dans la maladie d'Alzheimer

Le stress oxydant a un rôle clé dans la progression de la MA. En effet, des taux élevés d'A β ₁₋₄₀ et d'A β ₁₋₄₂ ont été associés à une élévation des niveaux d'oxydation des protéines, des lipides ou des acides nucléiques (Butterfield and Lauderback, 2002). Aujourd'hui, la cause et l'impact de ce stress oxydant dans la MA sont encore mal compris. Cependant plusieurs hypothèses pourraient expliquer son rôle. En effet, le stress oxydant serait responsable d'une perturbation de l'intégrité de la membrane cellulaire en modifiant la disposition asymétrique des phospholipides (Castegna et al., 2004). Cela entraînerait des altérations dans la structure et la fonction de la membrane ayant pour conséquence une neurotoxicité telle qu'elle est observée dans le cerveau des patients souffrant de MA (Subramaniam et al., 1997). Les protéines notamment impliquées dans la production d'ATP pourraient ainsi devenir non fonctionnelles, entraînant une altération du métabolisme énergétique au sein du cerveau (Tramutola et al., 2017). Cette action entraînerait par la suite une diminution des niveaux d'ATP et donc une augmentation de la production d'EROs mitochondriales, générant ainsi une autre source de stress oxydant dans la MA (Aluise et al., 2011). Une autre hypothèse proposée par les scientifiques serait une implication du stress oxydant dans la clairance de l'A β . En effet une production accrue d'A β pourrait accélérer une production des EROs et serait par conséquent responsable de l'oxydation de LRP1, une protéine responsable de l'efflux d'A β au niveau de la BHE (cf 1.6.1). Cette hypothèse se base sur une diminution de l'activité de la protéine LRP1 dans la MA (Jeynes and Provias, 2008). Cette production d'EROs directement induite par l'A β serait également à l'origine de la suractivation microgliale dans le cerveau en réponse aux dépôts amyloïdes présents dans le milieu extracellulaire (Nakajima and Kohsaka, 2001). Enfin des études *in vivo* et *in vitro* soutiennent une relation directe entre le stress oxydant et les dysfonctionnements synaptiques observés dans la MA (Kamat et al., 2016 ; Manczak et al., 2006 ; Reddy and Beal, 2008).

2.3 Le rôle protecteur des polyphénols dans les maladies neurodégénératives

Depuis quelques années, du fait du caractère multifactoriel de la MA rendant difficile la mise en place de thérapies efficaces, les antioxydants d'origine alimentaire sont devenus une piste de recherche dans la communauté scientifique car ils pourraient vraisemblablement participer à la défense de l'organisme contre le stress oxydant et ses conséquences, mais également car ce sont des molécules ayant par ailleurs plusieurs autres actions bénéfiques.

Les recherches se concentrent sur l'effet des polyphénols et leurs effets bénéfiques sur la « neuroprotection » dans le cas de la MA. Ainsi de nombreux polyphénols connus pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires ont été étudiés pour leurs effets sur l'agrégation et la désagrégation du peptide A β . De nombreuses études cliniques utilisant le resvératrol dans le cadre de plusieurs pathologies ont été menées, dont une en 2014 dans le but d'évaluer l'intérêt thérapeutique du resvératrol sur la MA. Il s'agissait d'une étude clinique de phase II conduite aux Etats-Unis par le National Institute of Aging sous le titre « Resveratrol for Alzheimer's disease » et qui a donné lieu à 2 publications (Sawda et al., 2017 ; Turner et al., 2015). Cette étude randomisée, réalisée chez des personnes atteintes de la MA légère à modérée, a duré 52 semaines et a comporté 119 participants recevant soit le placebo soit le resvératrol à la dose initiale hebdomadaire de 500 mg par voie orale, avec une augmentation de la dose par paliers de 500 mg toutes les 13 semaines, jusqu'à la dose de 1 g 2 fois par jour. Une IRM cérébrale et la collecte du LCR et du plasma ont été réalisées à l'inclusion et après la fin du traitement. Les résultats de cette étude ont montré que le resvératrol stabilisait de manière significative la baisse progressive des taux d'A β ₁₋₄₀ dans le plasma et le LCR chez les patients traités par le resvératrol par rapport aux patients non traités. Des résultats similaires mais non significatifs ont été décrits pour l'A β ₁₋₄₂ (Turner et al., 2015). De même, les niveaux plasmatiques de marqueurs pro-inflammatoires, tels que l'IL-1 α , l'IL-12P40, l'IL-12P70 et TNF- α , ont été réduits dans le groupe traité avec le resvératrol. Cependant, il a été décrit chez les patients traités par le resvératrol une perte du volume cérébral plus importante que les patients traités par le placebo mais cette observation qui semble défavorable n'a pas pu être expliquée (Turner et al., 2015). De plus, aucun effet n'a été observé concernant la protéine TAU phosphorylée dans le LCR. Ainsi, bien que le resvératrol semble avoir des effets sur le SNC, cette étude qui manque de résultats significatifs n'indique pas nécessairement un bénéfice clinique.

Durant la première année de ma thèse, nous avons réalisé une revue bibliographique sur le rôle des polyphénols dans l'agrégation des protéines impliquées dans la MA mais également dans la MP (α synucléine), ces deux maladies ayant pour point commun de présenter des dépôts protéiques toxiques au niveau du cerveau des personnes atteintes. Cette recherche bibliographique a conduit à la publication de la revue invitée « *Natural polyphenols effects on protein aggregates in Alzheimer's and Parkinson's prion-like diseases* » (Freyssin et al., 2018). Nous avons notamment répertorié les effets décrits dans la littérature des différents polyphénols sur la formation des fibrilles d'A β et la mise en place des plaques amyloïdes (**figure 21**).

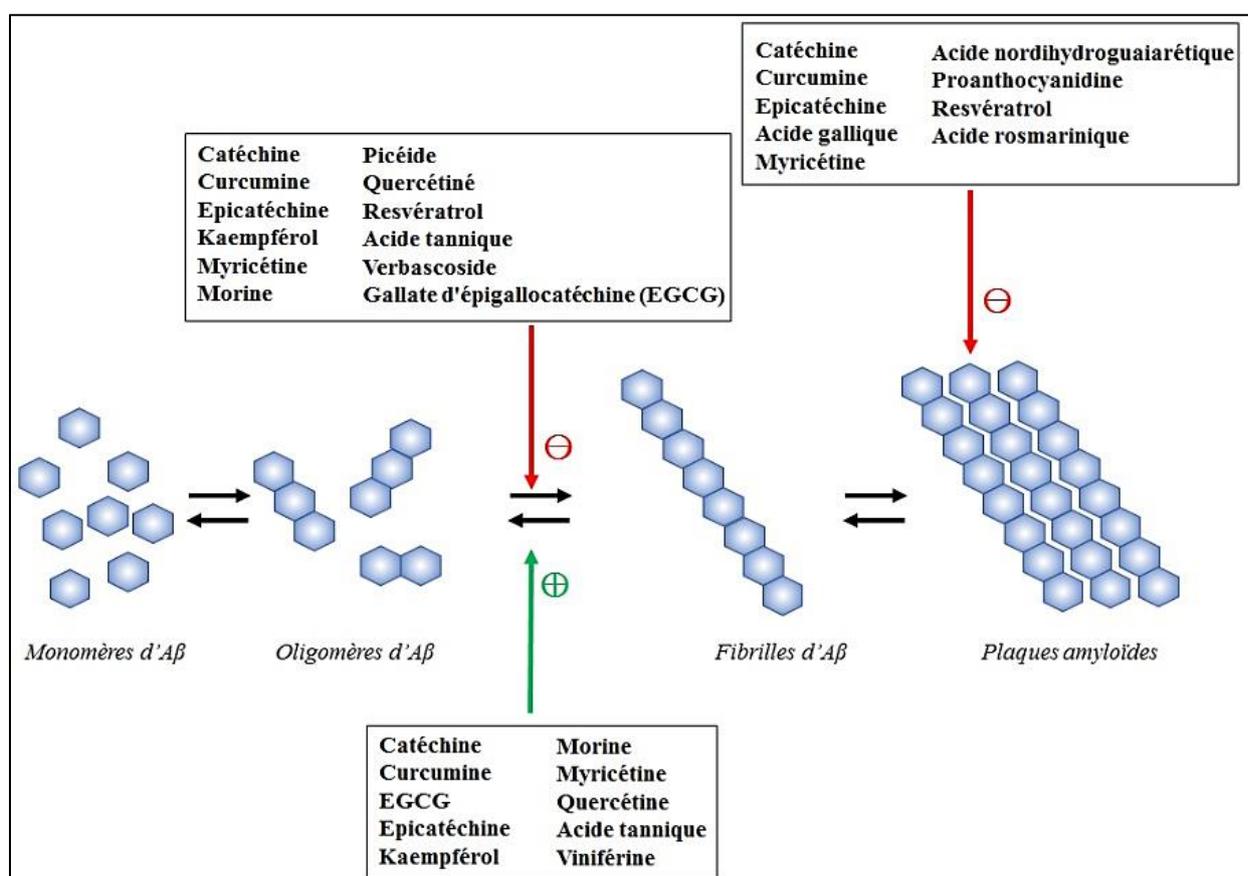


Figure 21 : Effets des polyphénols sur l'agrégation du peptide amyloïde dans la maladie d'Alzheimer

D'après (Freyssin et al., 2018)

Ainsi, de nombreux polyphénols comme le resvératrol, la curcumine ou l'EGCG sont décrits comme inhibant *in vitro* l'agrégation du peptide amyloïde. Ces propriétés inhibitrices passent par l'intermédiaire d'une interaction directe des polyphénols avec le peptide amyloïde. *In vivo*, des polyphénols comme la curcumine, la myricétine ou l'acide rosmarinique ont montré des propriétés neuroprotectrices en réduisant les niveaux d'A β et la formation des plaques notamment dans des modèles de souris Alzheimer. Ces polyphénols, lorsqu'ils sont injectés par voie intrapéritonéale

(i.p), atteignent le parenchyme cérébral (Caillaud et al., 2019). Ils peuvent ainsi se lier aux plaques amyloïdes et réduire leur formation. De plus, certains polyphénols auraient la capacité de réduire l'hyperphosphorylation de la protéine TAU dans la MA. C'est notamment le cas de l'EGCG, décrit pour sa capacité *in vitro* à se lier à la protéine TAU sur son site de phosphorylation avec une affinité élevée et pouvant ainsi modifier la structure tridimensionnelle de cette protéine, conduisant à l'inhibition de son agrégation.

Bien que le resvératrol et ses dérivés aient été décrits comme ayant de nombreuses propriétés bénéfiques *in vitro*, une approche *in vivo* prenant en compte le métabolisme et la biodisponibilité des polyphénols au sein de l'organisme reste primordiale scientifiquement.

Dans ce cadre, nous avons réalisé une deuxième revue bibliographique ciblant les effets bénéfiques des stilbènes d'origine naturelle dans des modèles animaux de la MA. Cette recherche bibliographique a conduit à la publication de la revue « *Natural stilbenes effects in animal models of Alzheimer's disease* » (Freyssin et al., 2020).

Ainsi, cette revue de la littérature a permis de répertorier les effets bénéfiques du resvératrol et de ses dérivés naturels (**figure 22**). Nous avons constaté que les modèles animaux étaient principalement des souris ou des rats mais demeuraient multiples. En effet, certaines études utilisaient des souris transgéniques exprimant l'APP et / ou PS1 avec des mutations familiales de la MA. D'autres modèles de souris décrits dans cette revue présentaient des symptômes de la MA induits par injection intracérébroventriculaire d'A β ₂₅₋₃₅ ou par injection de lipopolysaccharide (LPS) directement dans l'hippocampe (injection bilatérale) ou par injection i.p. Des modèles de la MA sporadique, qui sont des souris à vieillissement accéléré ont également été décrits. Enfin, les études qui ont utilisé des rats induisaient la MA par une injection d'A β ₂₅₋₃₅ dans le ventricule latéral de ces animaux ou par une ovariectomie combinée à un traitement avec du D-galactose. Les effets étudiés portaient également sur des paramètres très variables, tels que la charge et les dépôts amyloïdes, la neuroinflammation, la mort neuronale, la phosphorylation de TAU, les marqueurs du stress oxydant et l'intégrité de la BHE. Quelques études s'intéressaient à l'effet de ces stilbènes sur les troubles mnésiques ou le déclin cognitif. Mais nous avons pu constater que les effets *in vivo* de certains stilbènes n'avaient jamais été étudiés ou publiés.

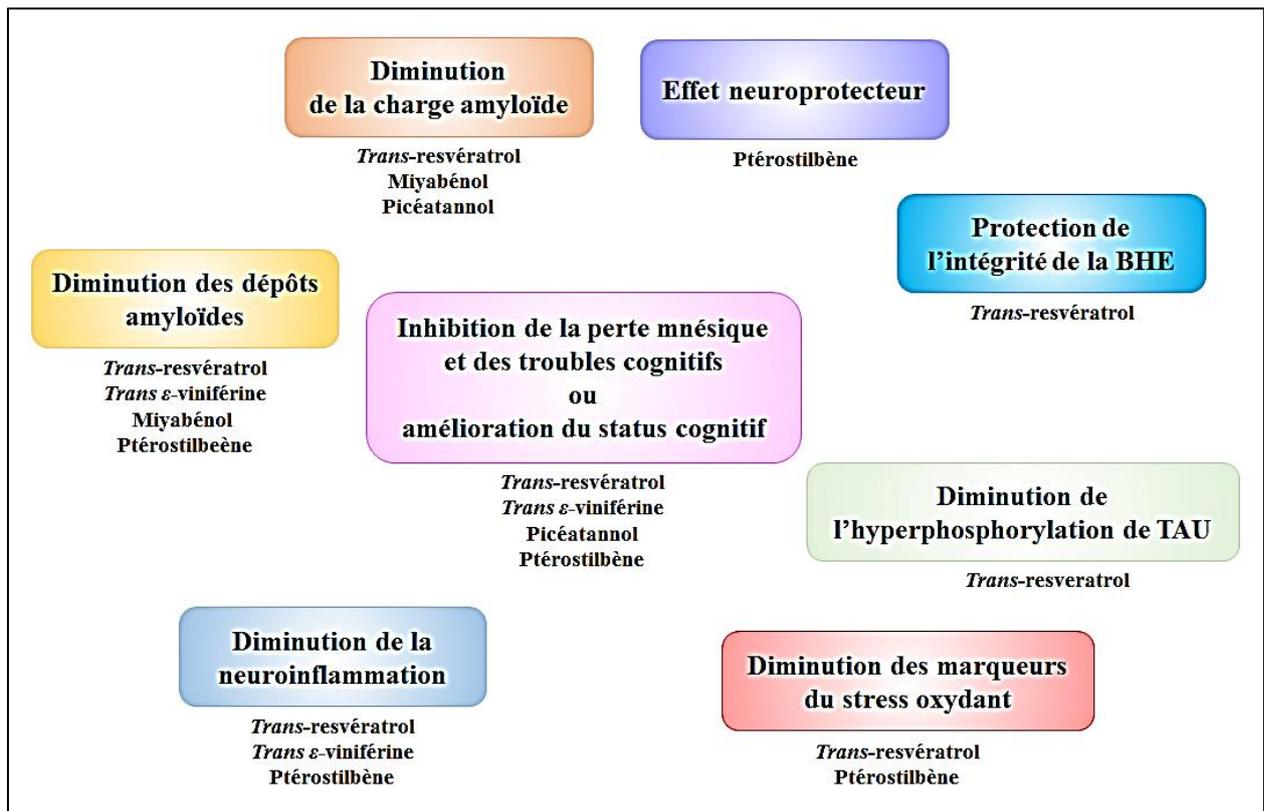


Figure 22 : Effets bénéfiques des stilbènes naturels dans des modèles animaux de la MA

D'après (Freyssin et al. 2020)

Revue 1

Freysin A, Page G, Fauconneau B*, Rioux Bilan A* (*Co-last authors).

Natural polyphenols effects on protein aggregates in Alzheimer's and Parkinson's prion-like diseases.

Neural Regeneration Research 2018; *Invited review*, 13(6):955-961. doi: 10.4103/1673-5374.233432.



● INVITED REVIEW

Natural polyphenols effects on protein aggregates in Alzheimer's and Parkinson's prion-like diseases

Aline Freyssin, Guylène Page, Bernard Fauconneau[†], Agnès Rioux Bilan^{*,*}

University of Poitiers, EA3808 NEUVACOD (Neurovascular Unit and Cognitive Disorders), Pôle Biologie Santé, Poitiers, France

Abstract

Alzheimer's and Parkinson's diseases are the most common neurodegenerative diseases. They are characterized by protein aggregates and so can be considered as prion-like disease. The major components of these deposits are amyloid peptide and tau for Alzheimer's disease, α -synuclein and synphilin-1 for Parkinson's disease. Drugs currently proposed to treat these pathologies do not prevent neurodegenerative processes and are mainly symptomatic therapies. Molecules inducing inhibition of aggregation or disaggregation of these proteins could have beneficial effects, especially if they have other beneficial effects for these diseases. Thus, several natural polyphenols, which have antioxidative, anti-inflammatory and neuroprotective properties, have been largely studied, for their effects on protein aggregates found in these diseases, notably *in vitro*. In this article, we propose to review the significant papers concerning the role of polyphenols on aggregation and disaggregation of amyloid peptide, tau, α -synuclein, synphilin-1, suggesting that these compounds could be useful in the treatments in Alzheimer's and Parkinson's diseases.

Key Words: natural polyphenols; protein aggregates; Alzheimer's disease; amyloid peptide; amyloid plaques; hyperphosphorylated tau; Parkinson's disease; α -synuclein; synphilin-1

*Correspondence to:

Agnès Rioux Bilan, Ph.D.,
agnes.rioux-bilan@univ-poitiers.fr.

#These authors contributed equally to this work.

orcid:

0000-0003-2798-8576
(Agnès Rioux Bilan)

doi: 10.4103/1673-5374.233432

Accepted: 2018-04-17

Introduction

General presentation of polyphenols

In plants, polyphenols (or phenolic compounds) play an essential role, in protection from ultraviolet radiation and against aggression by pathogens or predators, contribute to their colour and flavour and facilitate growth and reproduction. To date, more than 8000 natural polyphenols have been identified in plants (Pandey and Rizvi, 2009). They may be grouped into classes according to the shared structural characteristics of their carbon skeletons. The main classes include phenolic acids and derivatives (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic), flavonoids (flavanols, flavonols, flavones, flavanones, isoflavones, chalcones, anthocyanins), tannins (condensed or hydrolysable), stilbenes, lignans, coumarins, lignins (Naczka and Shahidi, 2006). Polyphenols share one common feature: an aromatic ring with at least one hydroxyl substituent. However, they vary greatly in their complexity from phenols to the highly polymerized tannins. They occur predominantly as conjugates with one or more sugars residues generally linked to hydroxyl groups or, less frequently, aromatic carbon atoms (Pandey and Rizvi, 2009). The principle sugar residue is glucose, while others (*e.g.*, galactose, rhamnose, xylose or arabinose) are also encountered (Bravo, 1998). When ingested, polyphenols enter the digestive system primarily in form of glycosides, although some aglycones may be present. Before absorption, these compounds must be hydrolysed by endogenous enzymes (Pandey and Rizvi, 2009). This metabolism should be kept in mind when interpreting results, since the forms reaching the blood and tissues are different from those present in food: the most common polyphenols in our diet are not necessarily those showing highest concentration of active metabolites in target tissues (Pandey and Rizvi, 2009).

Biological activities and health implications of polyphenols

In the last decade of 20th century, the major researches focused on antioxidant activity of polyphenols due to their properties to scavenge free radical such as reactive oxygen species or hydroxyl radicals, which are produced in living organisms. Due to their unpaired electron, free radicals are very reactive species and their overproduction can cause damage to all biological macromolecules (DNA, proteins, lipids), resulting in cell alteration. Polyphenols can also act as antioxidants through their capacity to chelate metal ions such as iron. Some of them have antioxidant activity stronger than the reference water soluble vitamin E analogue Trolox, (Fauconneau et al., 1997). There are increasing evidences that polyphenols may protect cell constituents against oxidative damage and limit various disease associated with oxidative stress. Number of *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that polyphenols intake limits the incidence of coronary heart diseases, in particular atherosclerosis in which low density lipoprotein (LDL) oxidation play a key mechanism in the development of this pathology. Likewise, studies provide evidence for a protective role of a diet rich in polyphenols against chronic diseases including cancers (Anantharaju et al., 2016) and diabetes (Jung et al., 2007). In more recent works, polyphenols may provide protection in neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) (Figure 1).

AD and PD

AD and PD are the most common neurodegenerative disorders. For demographic reasons, these two diseases affect an increasing percentage of population. The common molecular mechanism observed in these neurodegenerative diseases is the formation of protein aggregates (Hashimoto

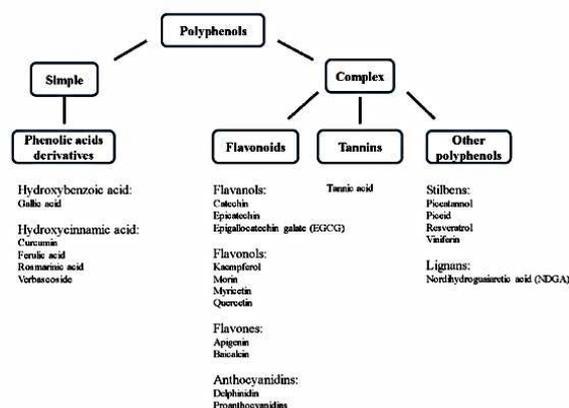


Figure 1 Classification of representative natural polyphenols reported in this article as modulating protein aggregates in Alzheimer's disease and Parkinson's disease.

et al., 2003). The ubiquitin-proteasome system cannot remove these aggregates not only because they are in excessive quantities but also because these proteins are misfolded, have excessive sizes and consequently present resistance to degradation. Indeed, aggregation and accumulation of these misfolded proteins in the central nervous system is due to a result of changes in the native proteins conformation and is consequent to aberrant production or overexpression of specific proteins, leading to progressive neurological impairment and neuronal dysfunction observed in AD (Hashimoto et al., 2003; Gadad et al., 2011) and in PD (Guerrero et al., 2013). Autophagy, as a lysosomal pathway, could play an important role in preventing the accumulation of abnormal proteins (Kroemer and Levine, 2008). However, defects of autophagy and accumulation of protein aggregates are observed in neurodegenerative diseases such as AD (Lee et al., 2010; Gusdon et al., 2012; Francois et al., 2014) and PD (Wu et al., 2011; Lynch-Day et al., 2012).

AD and PD share some neuropathological features with prion diseases and consequently these neurodegenerative diseases are considered as prion-like diseases. They involve proteins able to aggregate, β -amyloid ($A\beta$) peptide, tau, α -synuclein (α -syn) and synphilin-1, following conformational changes (Toni et al., 2017). Moreover, metal ions can directly bind to them, enhancing aggregates formation.

AD is the most prevalent neurodegenerative disease. It accounts for an estimated 60% to 80% of all dementias (Alzheimer's Association, 2017), which concerns more than 36 million people in the World and the number of affected people is expected to be more than 115 million in 2050 (Alzheimer's Disease International, 2015). The estimated prevalence exceeds 10% for people over 65 years old (Alzheimer's Association, 2017). Extracellular senile plaques, constituted by deposition of aggregated $A\beta$ peptides and intraneuronal neurofibrillary tangles (NFTs) composed by accumulation of hyperphosphorylated tau protein are two of the major histopathological lesions leading to the progression of the pathogenesis in this disease. $A\beta$ is mainly produced by amyloidogenic metabolism of amyloid precursor protein, by the

sequential action of β - and γ -secretases, leading to the liberation of peptide between 39 and 42 amino-acid residues. This last undergoes conformation modifications, acquires a β -sheet structure and so becomes prone to aggregation (Greenwald and Riek, 2010, 2012). Tau is a soluble microtubule protein present in neuronal cells that plays a dominant role in axonal growth and neuronal development by stabilizing the micro-tubular assembly (Mietelska-Porowska et al., 2014). Under pathological conditions, up regulation of kinases (Dolan and Johnson, 2010) and down regulation of phosphatases (Liu et al., 2005) result in hyperphosphorylation of tau protein, leading to double helical insoluble filaments and tangled clumps NFTs. These last form inside the neuronal cell body during the progression of AD and are relatively insoluble protein complexes (Iqbal et al., 2014).

PD is a progressive motor disease and is the second most common neurodegenerative disease after AD. It affects close to 5% of people over 65 years old (Wirdefeldt et al., 2011). It is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons from the substantia nigra region of the brain, with some surviving nigral dopaminergic neurons containing cytosolic filamentous inclusions known as Lewy bodies (LBs) and Lewy neurites (LNs). These toxic proteins are due to abnormal protein folding and endoplasmic reticulum stress and there are many, such as α -syn (Irizarry et al., 1998; Spillantini et al., 1998) and synphilin-1 (Wakabayashi et al., 2000). α -syn, a major fibrillar component of LBs and LNs, is a presynaptic neuronal protein. Its precise function is not well known but it may play a role in signals transmission and in the regulation of the dopamine. In physiological conditions, α -syn is soluble. However, under pathological conditions, it undergoes abnormal conformation, becomes insoluble and leads to toxic aggregates. Synphilin-1 is an α -syn-interacting protein also present in the LBs, which promotes inclusion formation (Xie et al., 2010).

Polyphenols Effects on Aggregates in Alzheimer's and Parkinson's Prion-Like Diseases

Polyphenols are described to have beneficial effects on prion-like diseases (Additional Table 1 and Figure 2). Indeed, PAQUID study described that consumption of high levels of flavonoid polyphenols decrease the risk of dementia by 50% (Commenges et al., 2000). Many of them decrease amyloid, tau, α -syn and synphilin-1 deposits, by inhibition of their formation or by disaggregation of them (Stefani and Rigacci, 2014; Sivanesan and Andersen, 2016; Nabavi et al., 2017; Velander et al., 2017; Habtemariam, 2018). These properties are mediated by direct interaction with proteins or by interaction with metal ions promoting aggregation. Indeed, polyphenols are able to bind and chelate many different bivalent metals, such as Cu^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{2+} , involved in amyloid aggregation (Singh et al., 2008; Mandel et al., 2011). Since soluble amyloid oligomers of $A\beta$, α -syn and tau appear to have structural features in common (Kayed et al., 2003), a number of compounds that inhibited the assembly of $A\beta$, α -syn and tau may recognise and interact with this common structure.

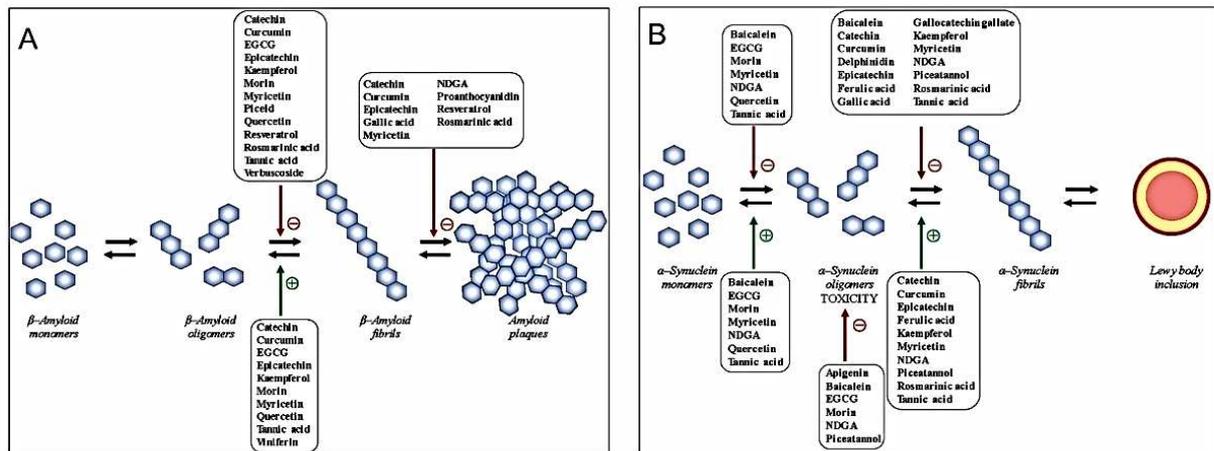


Figure 2 Main effects of cited polyphenols modulating protein aggregates in Alzheimer's disease (A) and Parkinson's disease (B). EGCG: Epigallocatechin 3-gallate; NDGA: nordihydroguaiaretic acid.

Polyphenols and AD

Polyphenols and β-amyloid peptide

Effects of numerous natural polyphenols on *in vitro* β-amyloid peptide aggregation/disaggregation and on amyloid deposits formation *in vivo* are studied and described (Figure 2A and Additional Table 1). Many polyphenols, such as wine- or olive tree-related polyphenols, tannic acid, curcumin, and EGCG, were described to inhibit *in vitro* β-amyloid aggregation in fibrils and disaggregation of them (Velander et al., 2017). These properties are mediated by interaction with metal ions promoting aggregation or by direct interaction with amyloid peptide but also by direct interaction of them with polyphenols, notably by interfering with β-sheets (Toni et al., 2017).

Thus, Ono et al. (2003) showed by fluorescence spectroscopic analysis with thioflavin T and electron microscopy that, *in vitro*, wine-related polyphenols (myricetin, morin, quercetin, kaempferol (+)-catechin and (-)-epicatechin) dose-dependently inhibited formation and extension of fibrillary Aβ (fAβ) from Aβ₁₋₄₀ and Aβ₁₋₄₂. Moreover, these polyphenols dose-dependently destabilized preformed fAβs, with overall activity of the molecules examined in the order of: myricetin = morin = quercetin > kaempferol > (+)-catechin = (-)-epicatechin. The same authors demonstrated similar effects for tannic acid on the formation, extension and destabilization of fAβ (Ono et al., 2004). Rivière et al. (2007) examined the effects of stilbenes on Aβ₂₅₋₃₅ fibril formation, using UV-visible measurements and electron microscopy. The inhibitory properties of resveratrol, piceid, resveratrol diglucoside, piceatannol, astringin and viniferin were characterized and compared. Resveratrol and piceid were shown to be the most efficient to inhibit Aβ polymerization (Rivière et al., 2007). The ability of multiple polyphenolic glycosides and their esterified derivative to interact with metal ions and metal-free/-associated Aβ, and further control both metal-free and metal-induced Aβ aggregation was investigated through western blot assay, transmission electron microscopy, ultraviolet (UV)-visible spectroscopy, fluorescence spectroscopy,

and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy by Korshavn et al. (2015). The cytotoxicity of the compounds and their ability to mitigate the toxicity induced by both metal-free and metal-bound Aβ were also examined. Thus, verbascoside, natural product present in olive tree and its esterified derivative was shown to regulate the aggregation and cytotoxicity of metal-free and/or metal-associated Aβ to different extents (Korshavn et al., 2015). A recent study demonstrated that trans ε-viniferin disaggregated Aβ₁₋₄₂ with better efficiency than resveratrol (Vion et al., 2017).

These effects can be partially explained by interaction of polyphenols with amyloid peptide. Thus, a non-covalent complex between ε-viniferin glucoside and Aβ was observed by electrospray ionization mass spectrometry (Richard et al., 2011). Moreover, in a recent review, rosmarinic acid was described to also directly interact with Aβ₁₋₄₂ (Taguchi et al., 2017). These molecules interfere with β-sheet to exert their activity (Francioso et al., 2015). But polyphenols effects on metal ions contribute also to their properties. An assay using 2-(5-Bromo-2-pyridylazo)-5-[N-propyl-N-(3-sulfopropyl)amino]phenol disodium salt dihydrate (5-Br-PAPS) allowing the examination of Zn(II) and Cu(II) complexation showed that gallic acid, EGCG, and curcumin are multifunctional agents (Chan et al., 2016).

Many *in vivo* studies demonstrated in different AD models that polyphenols inhibited amyloid deposits in brain mice. Thus, it was shown that curcumin, injected peripherally into aged APP^{Swe}Tg2576 mice crossed the blood brain barrier (BBB) and bound to amyloid plaques, reducing amyloid levels and plaque formation decisively (Yang et al., 2005). Another study, using *in vivo* multiphoton microscopy, demonstrated that curcumin crossed the BBB and labeled senile plaques and cerebrovascular amyloid angiopathy in another model of AD, APP(Swe)/PS1dE9 mice. Moreover, systemic treatment on these mice with curcumin for 7 days cleared and reduced existing plaques (Garcia-Alloza et al., 2007). When these same mice were fed during 6 months, between 3 and 9 months of age, with polyphenol-rich grape

seed extract, containing gallic acid, catechin, epicatechin and proanthocyanidins or with curcumin, a decrease of A β deposition was observed (Wang et al., 2009). In the same way, when APP^{swe}Tg2576 were fed with myricetin, nordihydroguaiaretic acid (NDGA) or rosmarinic acid for 10 months from the age of 5 months, amyloid plaques in mice brains were significantly decreased (Hamaguchi et al., 2009). Resveratrol administrated by food at AD Tg19959 mice during 45 days also diminished plaque formation in a region specific manner, in medial cortex, striatum and hypothalamus (Karuppagounder et al., 2009).

Polyphenols and tau

Some polyphenols were also shown to inhibit phosphorylation and aggregation of tau. For example, EGCG was described to bind tau in this phosphorylation site with high affinity and to modify tridimensional structure of tau, leading to inhibition of its aggregation (Gueroux et al., 2017). A recent study showed that, by direct interaction with tau, rosmarinic acid prevented β -sheet assembly (Cornejo et al., 2017). Grape seed-derived polyphenol extract seems to potentially interfere with the assembly of tau peptides into neurotoxic aggregates (Wang et al., 2010). Same authors showed that oral administration of this extract significantly decreased the development of AD type tau neuropathology in the brain of Thy-1 mutated human tau (TMHT) mouse model of AD through mechanisms associated with attenuation of extracellular signal-receptor kinase 1/2 signaling in the brain (Wang et al., 2010). Moreover, polyphenols induce disaggregation of aggregated tau (Duff et al., 2010) and modify ultrastructure of paired helical filaments isolated from AD brains, decreasing enlargement of filaments (Ksiezak-Reding et al., 2012). Both daily intraperitoneal injections between 12 and 14 months and oral treatment between 8 and 14 months by green tea EGCG induced decrease of insoluble hyperphosphorylated tau in brain of APP^{swe}Tg2576 mice (Rezai-Zadeh et al., 2005, 2008). Moreover, a systemic treatment with curcumin during 7 days, partially restored distorted neurites in APP(Swe)/PS1dE9 mice (Garcia-Alloza et al., 2007).

Polyphenols and PD

Polyphenols and α -syn

In vitro, α -syn has been shown to form amyloid fibrils and these fibrils have been detected in patient with PD in the form of plaques in the brain. However, autopsies have shown that there is no correlation between the amount of fibrils and the severity of PD (Goldberg and Lansbury, 2000). A prominent hypothesis is that the soluble β -oligomers which are formed prior to the formation of mature fibrils are the cause of cytotoxicity, probably by membrane pore formation (Sivanesam and Andersen, 2016). Therefore, the prevention of protein aggregation and oligomerization is an attractive strategy in combating the neurodegeneration because it acts on the very beginning of the proposed cellular pathway leading to cell death. In order to modulate amyloidogenesis pathways, common strategies are (i) to

prevent α -syn from forming toxic oligomers, (ii) to increase the amyloidogenesis so that α -syn spends very little time in the presumably toxic oligomers state, and (iii) to direct α -syn to form off-pathway non-toxic aggregates (Sivanesam and Andersen, 2016).

Effects of natural polyphenols on α -syn aggregation/disaggregation are studied and described (**Figure 2B** and **Additional Table 1**). Using fluorescence spectroscopy with thioflavin S and electron microscopy, Ono and Yamada (2006) examined the effects of 13 antioxidants on the formation and destabilization of preformed α -syn fibrils. Their anti fibrillogenic and fibril-destabilizing activity was in the order: tannic acid = nordihydroguaiaretic acid = curcumin = rosmarinic acid = myricetin > kaempferol = ferulic acid > catechin = epi-catechin. Thus, they concluded that these antioxidants could prevent the development of α -synucleinopathies, not only through scavenging reactive oxygen species, but also through directly inhibiting the deposition of fibrils in the brain. Masuda et al. (2006) tested 39 polyphenols and 14 from them are strong inhibitors of α -syn filament assembly. Baicalein, delphinidin, gallic acid, and rosmarinic acid seem to be of particular interest for their properties to inhibit α -syn filament formation. They formed soluble, non cytotoxic (on human neurons SH-SY5Y cells), oligomeric α -syn, probably by binding to the C-terminal region, suggesting that this may be the mechanism by which filament formation is inhibited. 48 different flavonoids belonging to several classes were tested by Meng et al. (2010) for their ability to inhibit the aggregation of α -syn by stabilizing non-pathogenic protein conformation. Majority of the flavonoids inhibit α -syn polymerization either delaying or completely abolishing fibril formation and disaggregate the preformed fibrils into monomer and non-pathogenic oligomers. Molecule such as baicalein tightly bind to the protein and greatly stabilize its native unfolded conformation. The mechanism of the strong inhibition is mostly due to the formation of Schiff base (Meng et al., 2009). Hong et al. (2008) specified that baicalein-stabilized oligomers are β -sheet-enriched according to Circular Dichroism and Fourier Transform Infra Red analysis. They did not form fibrils even after very prolonged incubation. Oligomers were extremely stable. These baicalein-stabilized oligomers, being added to the solution of the aggregating α -syn, were able to noticeably inhibit its fibrillation. Using confocal single-molecule fluorescence spectroscopy, Caruana et al. (2011) used the structural diversity of 14 polyphenols to define key molecular scaffolds most effective in inhibiting oligomer formation by α -syn and disaggregating pre-formed oligomers. They found that baicalein, EGCG, nordihydroguaiaretic acid, morin, myricetin, quercetin and tannic acid have strong effects. They conclude that the best candidate required: (1) aromatic recognition elements that would allow non-covalent binding to the α -syn monomer/oligomer and (2) hydroxyl groups (especially the presence of three > two > one -OH group on the same ring structure) that would hinder the progress of the self-assembly process and/or destabilize its structure. In another work, Caruana confirmed the ability of α -syn oligo-

mers to permeabilise phospholipids membranes, potentially *via* pore-forming mechanism resembling the mechanism of neuronal toxicity *in vivo* (Caruana et al., 2012). They found that a group of small-molecule polyphenols (Nordihydroguaiaretic acid, Morin, Baicalein and Apigenin) strongly protect against membrane perturbation induced by aggregated wild-type and mutant (A30P, A53T) α -syn.

Some studies focused more specifically on one polyphenol and drew attention. Curcumin has been extensively studied on different models of neurodegenerative diseases and the results suggested that it could be of interest in the treatment of these pathologies. However, the potential efficacy of curcumin is limited owing to its poor potency and bioavailability. For this reason, Ahsan et al. (2015) screened different curcumin derivatives and they found that curcumin pyrazole derivatives inhibit α -syn aggregation and reduce α -syn associated neurotoxicity by employing several biophysical, imaging techniques, dot blot and cell based assays. EGCG bind to the natively unfolded polypeptides, forming complexes and preventing their conversion into toxic, on-pathway aggregation intermediates. The stimulation of this off-pathway led to the reduced cytotoxicity (Ehrnhoefer et al., 2008). It has also been suggested that EGCG is capable of binding to the oligomeric state of α -syn, destabilizing it and preventing it from interacting with membranes that would ultimately lead to cytotoxicity (Lorenzen et al., 2014). In a recent study, Yang et al. (2017) showed that EGCG exhibited its protective effect against α -syn mediated cytotoxicity, not only by producing the off-pathway compact oligomers, but also by facilitating the conversion of "active" oligomers into fibrils, thus accelerating the removal of active oligomers which could exert the membrane disruption and subsequent cellular degeneration. Gallic acid potently inhibited the formation of fibrils of α -syn and reduced the rate of formation of oligomers (Liu et al., 2014). It binds to soluble, non-toxic oligomers and stabilize their structure. Additionally, by using structure activity relationship, data obtained from 14 structurally similar benzoic acid derivatives showed that the inhibition of α -syn fibrillation was related to the number of hydroxyl moieties and their position on the phenyl ring (Ardah et al., 2014). Piceatannol inhibited the formation of α -syn fibrils and was able to destabilize preformed filaments. Furthermore, it protected PC12 (neuron like) cells against α -syn-induced toxicity (Temsamani et al., 2016). Albani et al. (2009) showed that resveratrol pre-treatment protect SK-N-BE cells from the toxicity arising from aggregation-prone protein (α -syn (A30P), mutated α -syn in familial Parkinsonism).

In animal models of PD, several studies clearly demonstrated that various polyphenols possess neuroprotective effects, but no study provided information on interaction between polyphenols and α -syn and on fibrils formation.

Polyphenols and synphilin-1

Few studies described the role of polyphenols in aggregation of synphilin-1. However, Pal et al demonstrated that a curcumin analogue, the 3,5-bis(2-fluorobenzylidene) piperidin-4-one induced a marked decrease in synphilin-1

aggregation in the dopaminergic SHSY-5Y cells (Pal et al., 2011). This curcumin analog prevents this aggregation by preventing covalent modifications and by maintaining the expression of the protein disulfide isomerase.

Conclusion

This paper reviews the significant papers that demonstrated beneficial effects of natural polyphenols against protein aggregates found in AD and PD. These properties can be explained by the capacity of polyphenols to inhibit aggregation of major components of pathological aggregates, *i.e.*, A β in amyloid plaques, tau in NTF, α -syn and synphilin-1 in LB and LNs and to partially disaggregate them. Many mechanisms are implicated, such as direct interaction of polyphenols with β -sheets of these proteins, leading to inhibition of abnormal conformational changes or hyperphosphorylation, but also by interaction with metal ions promoting aggregation. These effects are particularly interesting because polyphenols possess other beneficial properties, such as antioxidative, anti-inflammatory, pro-autophagic and neuroprotective activities. These properties, by themselves, may participate in the reduction in protein aggregation and deposition, without a direct effect of polyphenols on the process of protein aggregation and deposition. As multi-targeting drugs, polyphenols may lead to the development of therapeutic agents that could prove useful in combating AD and PD. However, it is difficult to predict nontoxic efficient doses for *in vivo* studies and clinical trials, because there is not necessarily a conversion relationship between *in vitro* and *in vivo* doses, notably because *in vivo* experiments are influenced by complex factors such as neuroendocrine system and immunity (Chen et al., 2018). Moreover, the doses between humans and animals are usually converted by body surface area calculation method, but this result may be not reliable because of the differences in drug metabolism between these two species.

To our knowledge, no clinical trial studied the role of polyphenols in the formation of protein aggregates in prion-like diseases. The only clinical studies investigating polyphenols effects in neurodegenerative diseases evaluated their role to prevent or treat cognitive impairment associated with neurodegeneration. Such, clinical trials using only resveratrol and curcumin showed their efficacy to preserve or restore cognitive function (Mazzanti and Di Giacomo, 2016), but these beneficial effects are not necessary be explained only by their action on aggregates. It would be necessary to evaluate beneficial effects of the other polyphenols on major symptoms in AD and PD, *i.e.*, cognitive decline in AD and motor disorders in PD and to clarify relation between the role of polyphenols on protein aggregates and their symptomatic effects.

Acknowledgments: We thank the association "France Alzheimer Vienne" for its constant encouragement.

Author contributions: AF, BF and ARB wrote the paper, GP gave advice during the writing of the manuscript.

Conflicts of interest: The authors declare no competing financial and scientific interests.

Financial support: None.

Copyright license agreement: The Copyright License Agreement has been signed by all authors before publication.

Plagiarism check: Checked twice by iThenticate.

Peer review: Externally peer reviewed.

Open access statement: This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

Open peer review report:

Reviewer: Xavier d'Anglemont de Tassigny, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Spain.

Comments to authors: The paper provides an updated overview of the effect of polyphenol on protein aggregation in the two major neurodegeneration diseases. It fairly sounds like a catalog but will definitely help other researchers in the field to look for the cited references. The authors have made a considerable effort to gather a collection of recent studies favoring the use of polyphenols as a potential treatments to prevent the protein aggregates in AD and PD.

Additional file:

Additional Table 1: Natural polyphenols effects in Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD): in vitro and in vivo studies cited in the paper.

References

- Ahsan N, Mishra S, Jain MK, Surolia A, Gupta S (2015) Curcumin Pyrazole and its derivative (N-(3-Nitrophenyl)pyrazole) Curcumin inhibit aggregation, disrupt fibrils and modulate toxicity of wild type and mutant alpha-synuclein. *Sci Rep* 5:9862.
- Albani D, Polito L, Batelli S, De Mauro S, Fracasso C, Martelli G, Colombo L, Manzoni C, Salmona M, Caccia S, Negro A, Forloni G (2009) The SIRT1 activator resveratrol protects SK-N-BE cells from oxidative stress and against toxicity caused by alpha-synuclein or amyloid-beta (1-42) peptide. *J Neurochem* 110:1445-1456.
- Alzheimer's Disease International (2015) World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia. An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. Alzheimer's Disease International (ADI).
- Alzheimer's Association (2017) 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 13:325-373.
- Anantharaju PG, Gowda PC, Vimalambike MG, Madhupantula SV (2016) An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutr J* 15:99.
- Ardah MT, Paleologou KE, Lv G, Abul Khair SB, Kazim AS, Minhas ST, Al-Tel TH, Al-Hayani AA, Haque ME, Eliezer D, El-Agnaf OM (2014) Structure activity relationship of phenolic acid inhibitors of alpha-synuclein fibril formation and toxicity. *Front Aging Neurosci* 6:197.
- Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56:317-333.
- Caruana M, Hogen T, Levin J, Hillmer A, Giese A, Vassallo N (2011) Inhibition and disaggregation of alpha-synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. *FEBS Lett* 585:1113-1120.
- Caruana M, Neuner J, Hogen T, Schmidt F, Kamp F, Scerri C, Giese A, Vassallo N (2012) Polyphenolic compounds are novel protective agents against lipid membrane damage by alpha-synuclein aggregates in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1818:2502-2510.
- Chan S, Kantham S, Rao VM, Palanivelu MK, Pham HL, Shaw PN, McGearry RP, Ross BP (2016) Metal chelation, radical scavenging and inhibition of A β ₄₂ fibrillation by food constituents in relation to Alzheimer's disease. *Food Chem* 199:185-194.
- Chen SQ, Wang ZS, Ma YX, Zhang W, Lu JL, Liang YR, Zheng XQ (2018) Neuroprotective effects and mechanisms of tea bioactive components in neurodegenerative diseases. *Molecules* 23:E512.
- Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger-Gateau P, Dartigues JF (2000) Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol* 16:357-363.
- Cornejo A, Aguilar Sandoval F, Caballero L, Machuca L, Munoz P, Caballero J, Perry G, Ardiles A, Areche C, Melo F (2017) Rosmarinic acid prevents fibrillation and diminishes vibrational modes associated to beta sheet in tau protein linked to Alzheimer's disease. *J Enzyme Inhib Med Chem* 32:945-953.
- Dolan PJ, Johnson GV (2010) The role of tau kinases in Alzheimer's disease. *Curr Opin Drug Discov Devel* 13:595-603.
- Dong W, Wang R (2016) Effects of resveratrol-induced cellular autophagy in control of neurodegenerative diseases. *Yao Xue Xue Bao* 51:18-22.
- Duff K, Kuret J, Congdon EE (2010) Disaggregation of tau as a therapeutic approach to tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 7:235-240.
- Ehrnhoefer DE, Bieschke J, Boeddrich A, Herbst M, Masino L, Lurz R, Engemann S, Pastore A, Wanker EE (2008) EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 15:558-566.
- Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguette F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM (1997) Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci* 61:2103-2110.
- Francioso A, Punzi P, Boffi A, Lori C, Martire S, Giordano C, D'Erme M, Mosca L (2015) β -sheet interfering molecules acting against β -amyloid aggregation and fibrillogenesis. *Bioorg Med Chem* 23:1671-1683.
- Francois A, Rioux Bilan A, Quellard N, Fernandez B, Janet T, Chassaing D, Paccalin M, Terro F, Page G (2014) Longitudinal follow-up of autophagy and inflammation in brain of APPswePS1dE9 transgenic mice. *J Neuroinflammation* 11:139.
- Gadad BS, Britton GB, Rao KS (2011) Targeting oligomers in neurodegenerative disorders: lessons from alpha-synuclein, tau, and amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis* 24 Suppl 2:223-232.
- Garcia-Alloza M, Borrelli LA, Rozkalne A, Hyman BT, Bacskai BJ (2007) Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *J Neurochem* 102:1095-1104.
- Goldberg MS, Lansbury PT Jr (2000) Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol* 2:E115-119.
- Greenwald J, Riek R (2010) Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure* 18:1244-1260.
- Greenwald J, Riek R (2012) On the possible amyloid origin of protein folds. *J Mol Biol* 421:417-426.
- Gueroux M, Fleau C, Slozeck M, Laguerre M, Pianet I (2017) Epigallocatechin 3-gallate as an inhibitor of tau phosphorylation and aggregation: a molecular and structural insight. *J Prev Alzheimers Dis* 4:218-225.
- Guerrero E, Vasudevaraju P, Hegde ML, Britton GB, Rao KS (2013) Recent advances in alpha-synuclein functions, advanced glycation, and toxicity: implications for Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 47:525-536.
- Gusdon AM, Zhu J, Van Houten B, Chu CT (2012) ATP13A2 regulates mitochondrial bioenergetics through macroautophagy. *Neurobiol Dis* 45:962-972.
- Habtemariam S (2018) Molecular pharmacology of rosmarinic and salvianolic acids: potential seeds for Alzheimer's and vascular dementia drugs. *Int J Mol Sci* 19:E458.
- Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M (2009) Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. *Am J Pathol* 175:2557-2565.
- Hashimoto M, Rockenstein E, Crews L, Masliah E (2003) Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromolecular Med* 4:21-36.
- Hong DP, Fink AL, Uversky VN (2008) Structural characteristics of alpha-synuclein oligomers stabilized by the flavonoid baicalein. *J Mol Biol* 383:214-223.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX (2014) Alzheimer disease therapeutics: focus on the disease and not just plaques and tangles. *Biochem Pharmacol* 88:631-639.
- Irizarry MC, Growdon W, Gomez-Isla T, Newell K, George JM, Clayton DF, Hyman BT (1998) Nigral and cortical Lewy bodies and dystrophic nigral neurites in Parkinson's disease and cortical Lewy body disease contain alpha-synuclein immunoreactivity. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:334-337.
- Jung EH, Kim SR, Hwang IK, Ha TY (2007) Hypoglycemic effects of a phenolic acid fraction of rice bran and ferulic acid in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Agric Food Chem* 55:9800-9804.
- Karuppagounder SS, Pinto JT, Xu H, Chen HL, Beal MF, Gibson GE (2009) Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 54:111-118.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300:486-489.
- Korshavn KJ, Jang M, Kwak YJ, Kochi A, Vertuani S, Bhunia A, Manfredini S, Ramamoorthy A, Lim MH (2015) Reactivity of metal-free and metal-associated amyloid-beta with glycosylated polyphenols and their esterified derivatives. *Sci Rep* 5:17842.
- Kroemer G, Levine B (2008) Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:1004-1010.
- Ksiazek-Reding H, Ho L, Santa-Maria I, Diaz-Ruiz C, Wang J, Pasinetti GM (2012) Ultrastructural alterations of Alzheimer's disease paired helical filaments by grape seed-derived polyphenols. *Neurobiol Aging* 33:1427-1439.

- Lee JH, Moon JH, Kim SW, Jeong JK, Nazim UM, Lee YJ, Seol JW, Park SY (2015) EGCG-mediated autophagy flux has a neuroprotection effect via a class III histone deacetylase in primary neuron cells. *Oncotarget* 6:9701-9717.
- Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA (2010) Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141:1146-1158.
- Lin TK, Chen SD, Chuang YC, Lin HY, Huang CR, Chuang JH, Wang PW, Huang ST, Tiao MM, Chen JB, Liou CW (2014) Resveratrol partially prevents rotenone-induced neurotoxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells through induction of heme oxygenase-1 dependent autophagy. *Int J Mol Sci* 15:1625-1646.
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Rossie S, Gong CX (2005) Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 280:1790-1796.
- Liu Y, Carver JA, Calabrese AN, Pukala TL (2014) Gallic acid interacts with alpha-synuclein to prevent the structural collapse necessary for its aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1844:1481-1485.
- Lorenzen N, Nielsen SB, Yoshimura Y, Vad BS, Andersen CB, Betzer C, Kaspersen JD, Christiansen G, Pedersen JS, Jensen PH, Mulder FA, Otzen DE (2014) How epigallocatechin gallate can inhibit alpha-synuclein oligomer toxicity in vitro. *J Biol Chem* 289:21299-21310.
- Lynch-Day MA, Mao K, Wang K, Zhao M, Klionsky DJ (2012) The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a009357.
- Mandel SA, Amit T, Weinreb O, Youdim MB (2011) Understanding the broad-spectrum neuroprotective action profile of green tea polyphenols in aging and neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* 25:187-208.
- Masuda M, Suzuki N, Taniguchi S, Oikawa T, Nonaka T, Iwatsubo T, Hisanaga S, Goedert M, Hasegawa M (2006) Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. *Biochemistry* 45:6085-6094.
- Mazzanti G, Di Giacomo S (2016) Curcumin and resveratrol in the management of cognitive disorders: What is the clinical evidence? *Molecules* 21:E1243.
- Meng X, Munishkina LA, Fink AL, Uversky VN (2009) Molecular mechanisms underlying the flavonoid-induced inhibition of alpha-synuclein fibrillation. *Biochemistry* 48:8206-8224.
- Meng X, Munishkina LA, Fink AL, Uversky VN (2010) Effects of various flavonoids on the alpha-synuclein fibrillation process. *Parkinsons Dis* 2010:650794.
- Mietelska-Porowska A, Wasik U, Goras M, Filipek A, Niewiadomska G (2014) Tau protein modifications and interactions: their role in function and dysfunction. *Int J Mol Sci* 15:4671-4713.
- Nabavi SF, Sureddi A, Dehpour AR, Shirooie S, Silva AS, Devi KP, Ahmed T, Ishaq N, Hashim R, Sobarzo-Sanchez E, Daglia M, Braidly N, Volpicella M, Vacca RA, Nabavi SM (2017) Regulation of autophagy by polyphenols: Paving the road for treatment of neurodegeneration. *Biotechnol Adv* doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.001.
- Nacz M, Shahidi F (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal* 41:1523-1542.
- Ono K, Yamada M (2006) Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for alpha-synuclein fibrils in vitro. *J Neurochem* 97:105-115.
- Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M (2004) Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1690:193-202.
- Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M (2003) Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 87:172-181.
- Pal R, Miranda M, Narayan M (2011) Nitrosative stress-induced Parkinsonian Lewy-like aggregates prevented through polyphenolic phytochemical analog intervention. *Biochem Biophys Res Commun* 404:324-329.
- Pandey KB, Rizvi SI (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2:270-278.
- Rezai-Zadeh K, Arendash GW, Hou H, Fernandez F, Jensen M, Runfeldt M, Shytle RD, Tan J (2008) Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces beta-amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice. *Brain Res* 1214:177-187.
- Rezai-Zadeh K, Shytle D, Sun N, Mori T, Hou H, Jeannot D, Ehrhart J, Townsend K, Zeng J, Morgan D, Hardy J, Town T, Tan J (2005) Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. *J Neurosci* 25:8807-8814.
- Richard T, Poupard P, Nassra M, Papastamoulis Y, Iglesias ML, Krisa S, Waffo-Teguo P, Merillon JM, Monti JP (2011) Protective effect of epsilon-viniferin on beta-amyloid peptide aggregation investigated by electrospray ionization mass spectrometry. *Bioorg Med Chem* 19:3152-3155.
- Riviere C, Richard T, Quentin L, Krisa S, Merillon JM, Monti JP (2007) Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Bioorg Med Chem* 15:1160-1167.
- Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Murthy V, Ramassamy C (2008) Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J Agric Food Chem* 56:4855-4873.
- Sivanesam K, Andersen NH (2016) Modulating the amyloidogenesis of alpha-synuclein. *Curr Neuropharmacol* 14:226-237.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6469-6473.
- Stefani M, Rigacci S (2014) Beneficial properties of natural phenols: high-light on protection against pathological conditions associated with amyloid aggregation. *Biofactors* 40:482-493.
- Taguchi R, Hatayama K, Takahashi T, Hayashi T, Sato Y, Sato D, Ohta K, Nakano H, Seki C, Endo Y, Tokuraku K, Uwai K (2017) Structure-activity relations of rosmarinic acid derivatives for the amyloid beta aggregation inhibition and antioxidant properties. *Eur J Med Chem* 138:1066-1075.
- Temsamani H, Krisa S, Decossas-Mendoza M, Lambert O, Merillon JM, Richard T (2016) Piceatannol and other wine stilbenes: a pool of inhibitors against alpha-synuclein aggregation and cytotoxicity. *Nutrients* 8:E367.
- Toni M, Massimino ML, De Mario A, Angiulli E, Spisni E (2017) Metal dyshomeostasis and their pathological role in prion and prion-like diseases: the basis for a nutritional approach. *Front Neurosci* 11:3.
- Velander P, Wu L, Henderson F, Zhang S, Bevan DR, Xu B (2017) Natural product-based amyloid inhibitors. *Biochem Pharmacol* 139:40-55.
- Vion E, Page G, Bourdeaud E, Paccalin M, Guillard J, Rioux Bilan A (2017) Trans epsilon-viniferin is an amyloid-beta disaggregating and anti-inflammatory drug in a mouse primary cellular model of Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci* 88:1-6.
- Wakabayashi K, Engelender S, Yoshimoto M, Tsuji S, Ross CA, Takahashi H (2000) Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 47:521-523.
- Wang J, Santa-Maria I, Ho L, Ksiezak-Reding H, Ono K, Teplow DB, Pasinetti GM (2010) Grape derived polyphenols attenuate tau neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 22:653-661.
- Wang J, Liu Y, Li XH, Zeng XC, Li J, Zhou J, Xiao B, Hu K (2017) Curcumin protects neuronal cells against status-epilepticus-induced hippocampal damage through induction of autophagy and inhibition of necroptosis. *Can J Physiol Pharmacol* 95:501-509.
- Wang SF, Wu MY, Cai CZ, Li M, Lu JH (2016) Autophagy modulators from traditional Chinese medicine: Mechanisms and therapeutic potentials for cancer and neurodegenerative diseases. *J Ethnopharmacol* 194:861-876.
- Wang YJ, Thomas P, Zhong JH, Bi FF, Kosaraju S, Pollard A, Fenech M, Zhou XF (2009) Consumption of grape seed extract prevents amyloid-beta deposition and attenuates inflammation in brain of an Alzheimer's disease mouse. *Neurotox Res* 15:3-14.
- Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J (2011) Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* 26 Suppl 1:S1-S8.
- Wu Y, Li X, Zhu JX, Xie W, Le W, Fan Z, Jankovic J, Pan T (2011) Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease. *Neurosignals* 19:163-174.
- Xie YY, Zhou CJ, Zhou ZR, Hong J, Che MX, Fu QS, Song AX, Lin DH, Hu HY (2010) Interaction with synphilin-1 promotes inclusion formation of alpha-synuclein: mechanistic insights and pathological implication. *FASEB J* 24:196-205.
- Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kaye R, Glabe CG, Frautschy SA, Cole GM (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem* 280:5892-5901.
- Yang JE, Rhoo KY, Lee S, Lee JT, Park JH, Bhak G, Paik SR (2017) EGCG-mediated protection of the membrane disruption and cytotoxicity caused by the 'active oligomer' of alpha-synuclein. *Sci Rep* 7:17945.

Revue 2

Freysin A, Page G, Fauconneau B*, Rioux Bilan A* (*Co-last authors).

Natural stilbenes effects in animal models of Alzheimer's disease.

Neural Regeneration Research 2020; *Review*, 15(5):843-849. doi:10.4103/1673-5374.268970.

REVIEW

Natural stilbenes effects in animal models of Alzheimer's disease

Aline Freyssin, Guylène Page, Bernard Fauconneau^{*}, Agnès Rioux Bilan^{*,*}

University of Poitiers, EA3808 NEUVACOD (Neurovascular Unit and Cognitive Disorders), Pôle Biologie Santé, Poitiers, France

Abstract

Alzheimer's disease is one of the most frequent neurodegenerative diseases. This pathology is characterized by protein aggregates, mainly constituted by amyloid peptide and tau, leading to neuronal death and cognitive impairments. Drugs currently proposed to treat this pathology do not prevent neurodegenerative processes and are mainly symptomatic therapies. However, stilbenes presenting multiple pharmacological effects could be good potential therapeutic candidates. The aim of this review is to gather the more significant papers among the broad literature on this topic, concerning the beneficial effects of stilbenes (resveratrol derivatives) in animal models of Alzheimer's disease. Indeed, numerous studies focus on cellular models, but an *in vivo* approach remains of primary importance since in animals (mice or rats, generally), bioavailability and metabolism are taken into account, which is not the case in *in vitro* studies. Furthermore, examination of memory ability is feasible in animal models, which strengthens the relevance of a compound with a view to future therapy in humans. This paper is addressed to any researcher who needs to study untested natural stilbenes or who wants to experiment the most effective natural stilbenes in largest animals or in humans. This review shows that resveratrol, the reference polyphenol, is largely studied and seems to have interesting properties on amyloid plaques, and cognitive impairment. However, some resveratrol derivatives such as gnetin C, trans-piceid, or astringin have never been tested on animals. Furthermore, pterostilbene is of particular interest, by its improvement of cognitive disorders and its neuroprotective role. It could be relevant to evaluate this molecule in clinical trials.

Key Words: Alzheimer's disease; amyloid; animal models; cognitive impairment; inflammation; natural stilbenes; neuroprotection; resveratrol; tau

*Correspondence to:
Agnès Rioux Bilan, PhD,
agnès.rioux-bilan@univ-poitiers.fr.

#Both authors contributed
equally to this work.

orcid:
0000-0003-2798-8576
(Agnès Rioux Bilan)

doi: 10.4103/1673-5374.268970

Received: July 15, 2019
Peer review started: July 18, 2019
Accepted: August 15, 2019
Published online: November 4, 2019

Introduction

General presentation of natural stilbenes

In the last three decades, the interest in molecules of polyphenolic structure has increased markedly. Natural phenolic compounds are plant secondary metabolites, with two or more phenolic rings. In order to protect themselves, plants produce these phytochemicals in response to exogenous stimuli such as excessive heat or ultraviolet exposures, insect attacks, and infections caused by microorganisms (bacteria or fungus) (Quideau et al., 2011). More than 8000 different phenolic compounds have been identified in the vegetal world. Natural polyphenols are particularly concentrated in fruits, vegetables, in beverages such as chocolate, tea, red wine, or in olive oil (Bravo, 1998).

Due to their antioxidant properties (Fauconneau et al., 1997), they have received an increasing attention in the prevention of various pathologies associated with oxidative stress, such as cancer (Rodriguez-Garcia et al., 2019), cardiovascular diseases, aging (Silva et al., 2019) or in others pathologies such as autoimmune diseases (Khan et al., 2019), infectious diseases (Li et al., 2019) but also in neurodegenerative pathologies (Freyssin et al., 2018). Preventive effects of polyphenols are mainly due to their antioxidant activity, by scavenging free radicals, but recent lines of evidences suggest that, moreover, they can directly target have multiple signalling cascades involved in development of numerous pathologies (Sirerol et al., 2016).

Stilbenes constitutes an important group of non-flavonoid phytochemicals characterized by a 1,2-diphenylethylenenu-

cleus (Riviere et al., 2012). Stilbenes are low molecular weight phenolics induced (phytoalexins) by biotic and abiotic stresses and act like antifungal compounds, enabling the plant to overcome pathogen attack (Bavaresco and Fregoni, 2001). There are more than 400 natural stilbenes (Shen et al., 2009), but they are observed only in a small and heterogeneous group of plants, including *Vitis vinifera* L., since stilbene synthase, the key enzyme involved in stilbene biosynthesis, is not ubiquitously expressed (Riviere et al., 2012).

Natural stilbenes are composed of resveratrol derivatives (Figure 1) and have been identified as *trans*-resveratrol (*trans*-3,4',5'-trihydroxystilbene), *trans*- and *cis*-piceid (*trans*- and *cis*-resveratrol 3-O- β -D-glucopyranoside), ϵ -viniferin (*trans*-resveratrol dimer), pterostilbene (*trans*-3,5-dimethoxy-4'-hydroxy-stilbene), piceatannol (*trans*-3,3',4,5'-tetrahydroxy-stilbene) or astringinin, and pallidol (*trans*-resveratrol dimer) (Bavaresco et al., 2009).

Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common neurodegenerative diseases. Around the world, it is estimated that there is one new case of dementia every 3 seconds (Patterson, 2018). Fifty million people worldwide were living with dementia in 2018 and this number is increasing rapidly in countries where people live longer. Indeed, this number could more than triple to 152 million in 2050 (Patterson, 2018). In AD, cerebral extracellular senile plaques and intraneuronal neurofibrillary tangles are two of the major histopathological lesions leading to the progression of the

pathogenesis in this disease. Senile plaques are constituted by deposition of aggregated β amyloid ($A\beta$) peptides (Greenwald and Riek, 2010), mostly generated by amyloidogenic metabolism of amyloid precursor protein (APP) by the sequential activity of β - and γ secretases, β -sheet structure of $A\beta$ leading to its aggregation. Rare familial AD are caused by a mutation in one of at least three genes, which code for presenilin 1 (PS1) and 2, two co-factors of γ secretases and for APP. Neurofibrillary tangles are composed by accumulation of hyperphosphorylated tau protein (Mietelska-Porowska et al., 2014). Moreover, these both hallmark proteins seem to present interactions and synergic effects in AD (Ittner and Gotz, 2011).

Resveratrol, one of the most studied and best known stilbene, has been associated with a wide range of pharmacological properties and is claimed to have numerous health functional properties (Thomasset et al., 2007; Szkudelska and Szkudelski, 2010, 2015; Petrovski et al., 2011), including in neuronal degenerative pathologies such as AD (Farooqui and Farooqui, 2009; Tellone et al., 2015).

This review focuses on *trans*-resveratrol and resveratrol derivatives, and their potential role in prevention and/or therapy specifically on one particularly worrying neurodegenerative disorder, AD, in animal models of this disease (Figure 2 and Table 1). These animal models are mainly either mice or rats but they are multiple. Some studies use transgenic mice expressing APP and/or PS1 with familial AD mutations. Other use mice, in which some symptoms of AD were induced by intracerebroventricular injection of $A\beta$ or by bilateral injection of lipopolysaccharide (LPS) into the hippocampus or by intraperitoneal injection of LPS. Mention may also be made of models of sporadic AD, which are accelerated aging mice. Studies which used rats treat them by an injection of $A\beta$ in their lateral ventricle, or by ovariectomy combined to treatment with D-galactose.

Search Strategy and Selection Criteria

Database: PubMed. Date: 1980 – August 2019. Eligibility criteria: reviews, *in vivo* studies, studies conducted on humans and animals and published in English. Keywords/keyterms: Stilbenes, Alzheimer's disease, animal models, *in vivo*, *Trans*-resveratrol, *Trans* *e*-viniferin, Gnetin C, Miyabenol C, *Trans*-piceid, Piceatannol, Astringenin, Astringin, Pterostilbene.

Beneficial Effects of Natural Stilbenes in Alzheimer's Disease

Trans-resveratrol

Most of studies concerning beneficial *in vivo* roles of stilbenes for AD concern *trans*-resveratrol, the reference polyphenol, largely quoted in the literature. The neuroprotective effects of this stilbene are mainly due to its capacity to 1) activate the signaling pathways implicated in cellular survival mediated by AMP-activated protein kinase (AMPK), phosphoinositide 3-kinase and Akt, 2) promote synaptic plasticity by extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, 3) inhibit pathways involved in apoptosis by decreasing caspase

3 and 12, Bax and cytochrome c expressions, 4) reduce amyloidogenesis and 5) enhance the clearance $A\beta$. Moreover, resveratrol has 6) antioxidant and 7) anti-inflammatory actions (Cicero et al., 2019).

Trans-resveratrol (*trans*-3,4',5-trihydroxystilbene) is a natural polyphenol, firstly isolated in 1940 and found in abundance in red wine. It is largely studied for its beneficial effects on the health, not only in AD but also in many other pathologies such as diabetes, obesity, and cancer. Only significant papers concerning *in vivo* effects of this stilbene for AD will be taken into account in this review.

Many studies showed that dietary supplementation of different AD model reduced some markers of this disease but results differ according to the studies.

One study evaluated effects of this supplementation on Tg199589 mice, transgenic animals expressing APP 695 with two familial AD mutations. These AD mice were orally supplemented with *trans*-resveratrol at 300 mg/kg from 45 to 90 days. After this treatment, neither *trans*-resveratrol nor its metabolites were detectable in brain. However, this supplementation induced decrease of plaque deposits, in particular in medial cortex, striatum and hypothalamus, without detectable activation of silent mating type information regulation 2 homolog (Sirtuin) 1, encoded by the SIRT1 gene, that deacetylates proteins that contribute to cellular regulation (Karuppagounder et al., 2009).

Orally administration of *trans*-resveratrol was also tested on 15 week-old male APP/PS1 transgenic mice (B6C3-Tg(APP_{swe}, PSEN1_{dE9}), a mouse model of cerebral amyloid deposition. After an administration of diet supplemented with 0.35% *trans*-resveratrol during 15 weeks, it was shown a reduction of $A\beta$ levels and amyloid deposition in the cerebral cortex, quantified by ELISA and immunofluorescence respectively (Vingtdeux et al., 2010). Moreover, a lower microglial activation, evaluated by ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1) labelling, associated with cortical amyloid plaque formation, was demonstrated, suggesting anti-inflammatory effect of this polyphenol (Capiralla et al., 2012).

In other study, *trans*-resveratrol was orally administered in the SAMP8 mice, which are a model of accelerated aging and consequently a model of sporadic and age-related AD. For this study, these mice received a diet supplemented with *trans*-resveratrol (1 g/kg), between 2 months of age and 9 months of age. This long-term dietary treatment has extended the average life expectancy and maximum shelf life in SAMP8. Moreover, it activated AMPK and pro-survival pathways such as SIRT1, reduced cognitive deficiency and had a neuroprotective effect by decreasing the amyloid load and reducing tau hyperphosphorylation (Porquet et al., 2013).

The reduction of amyloid load is not found in all studies. Dietary *trans*-resveratrol treatment of APP/PS1 mice did not decrease plaque burden in these mice. However, it increased glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3- β) phosphorylation on serine 9, associated with its inhibition and consequently inhibited abnormal phosphorylation of tau (Varamini et al.,

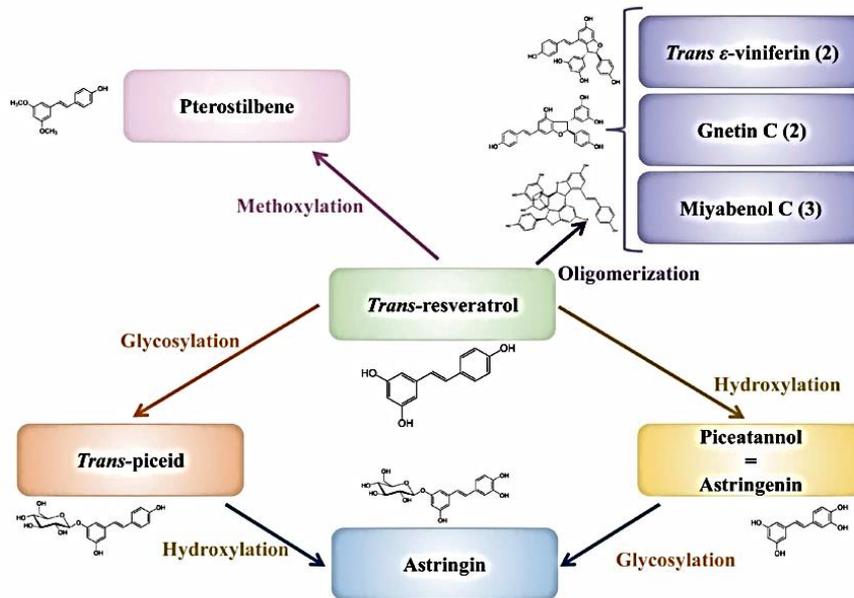


Figure 1 Natural stilbenes trans-resveratrol derivatives.

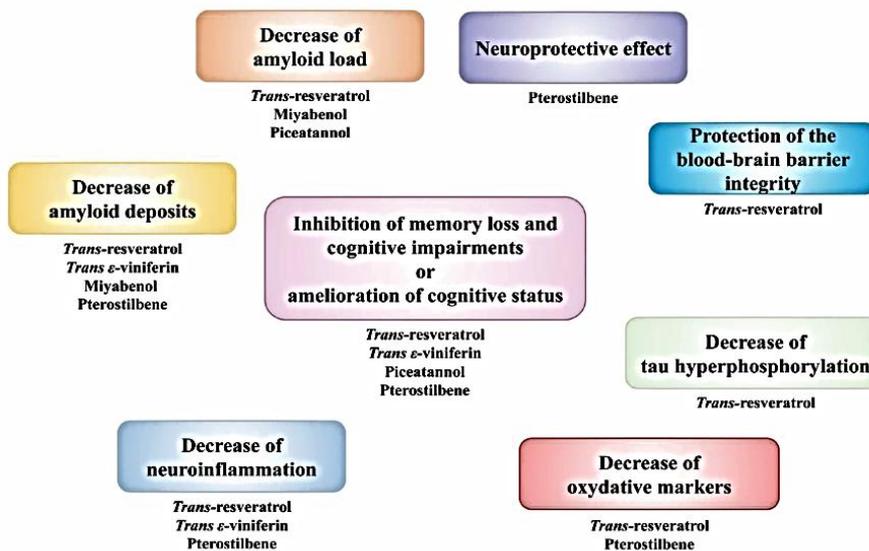


Figure 2 Beneficial effects of natural stilbenes.

2014). Moreover, it increased transthyretin level, an A β scavenger, and also raised drebrin, a key post-synaptic protein critical to maintaining proper synaptic function, which is decreased in AD (Varamini et al., 2014).

Effects of *trans*-resveratrol were also studied in rat models of AD. A first rat model of AD was established by the injection of A β_{25-35} in the lateral ventricle on adult Sprague-Dawley rats leading to a significant alteration in spatial memory and an increase of oxidative stress markers. In this model, the combination of the treatment with *trans*-resveratrol induced a significant improvement in spatial memory, a reduction in the cellular levels of inducible nitric oxide synthase and lipid peroxidation and an increase in the production of heme oxygenase-1, suggesting anti-oxidative role of this stil-

bene (Huang et al., 2011).

Another rat model of AD was established by ovariectomy combined injection of D galactose (100 mg/kg). Then, 12 weeks later, a heart perfusion *in vivo* with *trans*-resveratrol was done. This study established that treatments with 40 and 80 mg/kg of *trans*-resveratrol induced a decrease in the expression of glial fibrillary acidic protein, more important with the larger dose of *trans*-resveratrol. Moreover, treatments with 20, 40 and 80 mg/kg of *trans*-resveratrol decreased the levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) (Cheng et al., 2015).

Moreover, long-term *trans*-resveratrol consumption protected ovariectomized rats chronically treated with D-galactose against spatial memory impairment, by decreasing

Table 1 Natural stilbenes effects in AD: *in vivo* studies cited in the paper

Natural stilbenes	Research models	Treatments and doses Effects	References
<i>Trans-resveratrol</i>	Tg199589 mice: transgenic animals expressing APP695 with two familial AD mutations	Orally supplementation with <i>trans-resveratrol</i> at 300 mg/kg from 45 to 90 days. Decrease of plaque deposits, in particular in medial cortex, striatum and hypothalamus.	Karuppagounder et al., 2009
	15 week-old male APP/PS1 transgenic mice (B6C3-Tg(APPswe, PSEN1dE9)	Administration of diet supplemented with 0.35% <i>trans-resveratrol</i> during 15 weeks. Lower amyloid deposition and microglial activation associated with cortical amyloid plaque formation.	Vingtdeux et al., 2010; Capiralla et al., 2012
	SAMP8 mice (model of sporadic and age-related AD)	Administration of a supplemented with <i>trans-resveratrol</i> (1 g/kg), between 2 months of age and 9 months of age. Increase of life, activation of AMPK pathways and pro-survival routes (SIRT1). Reduction of cognitive impairment. Neuroprotective role by decreasing the amyloid burden and reducing tau hyperphosphorylation.	Porquet et al., 2013
	APP/PS1 mice	Dietary <i>trans-resveratrol</i> treatment. Absence of decrease plaque burden in these mice. Increase of GSK3- β phosphorylation, protein levels of transthyretin and drebrin.	Varamini et al., 2014
	Adult Sprague-Dawley rats, which are treated by an injection of A β ₂₅₋₃₅ in their lateral ventricle	Combination of the A β ₂₅₋₃₅ treatment with <i>trans-resveratrol</i> . Significant improvement in spatial memory. Reduction in the cellular levels of iNOS and lipid peroxidation and increase in the production of HO-1.	Huang et al., 2011
	Rat model of AD, established by ovariectomy combined injection of D-galactose (100 mg/kg)	Heart perfusion <i>in vivo</i> with <i>trans-resveratrol</i> at 20, 40 or 80 mg/kg. Decrease in the expression of GFAP at 40 and 80 mg/kg more important with the larger dose of resveratrol. Decrease of the TNF- α levels for the three concentrations.	Cheng et al., 2015
	Rat model of AD, established by ovariectomy combined chronic treatment with D-galactose (one intraperitoneal injection per day of d-gal 100 mg/kg for 12 weeks)	Daily intragastric doses of 20, 40 and 80 mg/kg <i>trans-resveratrol</i> . Protection against spatial memory impairment, by decreasing oxidative stress.	Zhao et al., 2012
	Rat model of AD, established by ovariectomy combined chronic treatment with D-galactose	Chronic administration of <i>trans-resveratrol</i> at 20, 40 and 80 mg/kg. Decrease of the insoluble Ab42 level in hippocampus by decreasing the expression of NF- κ B. Protection of the BBB integrity, by increasing the expression of Claudin-5 and decreasing RAGE and MMP-9 expressions.	Zhao et al., 2015
	Clinical study: mild to moderate AD patients	Treatment by <i>trans-resveratrol</i> (initially 500 mg once daily with dose escalation ending with 1000 mg twice daily) during 52 weeks. Passage of the BBB by resveratrol and its metabolites to exert their effects. Safety and good tolerance of resveratrol. Decrease of CSF A β ₄₂ and A β ₄₀ levels decline but increase of brain volume by resveratrol treatment Modulation of neuro-inflammation and decrease of cognitive decline.	Turner et al., 2015; Moussa et al., 2017
	<i>Trans-ϵ-viniferin</i>	Memory loss induced by intracerebroventricular injection with Ab ₂₅₋₃₅ in mice	Chronic treatment for 7 days with methanol extract (containing notably <i>trans-ϵ-viniferin</i>) at the concentrations of 50 and 100 mg/kg <i>per os</i> . Inhibition of memory loss.
Transgenic APPswePS1dE9 mice		Weekly intraperitoneal injection of <i>trans-ϵ-viniferin</i> at the dose of 10 mg/kg or its vehicle from 3 to 6 months of age. Decrease of amyloid deposits and inflammation in the brain of mice.	Caillaud et al., 2019
Gnetin C Miyabenol C	Absence of published <i>in vivo</i> studies 12-month-old transgenic APP/PS1 mice	Intracerebroventricular injection into the lateral ventricle for 3 days at the dose of 0.6 μ g/g. Reduction of both sAPP β and soluble A β ₄₂ and A β ₄₀ levels in the cortex and hippocampus.	Hu et al., 2015
<i>Trans-piceid</i> Piceatannol = Astringenin	Absence of published <i>in vivo</i> studies AD induced in adult male Swiss albino mice by unique intraperitoneal injection of LPS at the dose of 0.8 mg/kg	Daily intraperitoneal injection of piceatannol at 2.5 mg/kg for 6 days. Amelioration of cognitive status and decrease of cerebral A β ₄₂ concentration.	Hassaan et al., 2014
Astringin Pterostilbene	Absence of published studies SAMP8 mice (model of sporadic and age-related AD)	Diet-achievable supplementation of resveratrol or pterostilbene during 2 months Improvement by pterostilbene of cognitive status in these mice and decreasing of cellular stress, inflammation and AD markers.	Chang et al., 2012
	Learning and memory impairment and changes of microglia and neurons induced in male C57BL/6 mice by bilaterally intrahippocampal injection of LPS	Daily oral administration of pterostilbene at 20 or 40 mg/kg from 7 days before intrahippocampal administration of LPS. Decrease of cognitive disorders. Anti-inflammatory and neuroprotective role.	Hou et al., 2014

AD: Alzheimer's disease; A β : amyloid- β ; AMPK: AMP-activated protein kinase; APP: amyloid precursor protein; BBB: blood-brain barrier; CSF: cerebrospinal fluid; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GSK3: glycogen synthase kinase-3; HO-1: heme oxygenase-1; iNOS: inducible nitric oxide synthase; LPS: lipopolysaccharide; MMP-9: matrix metalloproteinase 9; NF- κ B: nuclear factor κ B; RAGE: receptor for advanced glycation end products; sAPP β : soluble β -fragment of amyloid precursor protein.

oxidative stress. For this study, intragastric doses of 20, 40 or 80 mg/kg *trans*-resveratrol were administered daily (Zhao et al., 2012).

Another study of the same authors has evaluated effect of *trans*-resveratrol on the integrity of blood brain-barrier (BBB). They showed that *trans*-resveratrol reduced the insoluble A β_{42} level in hippocampus, by decreasing the expression of nuclear factor-kappa B. It also protected the integrity of BBB in these rats, by 1) increasing the expression of claudin-5, a protein implicated in tight junctions, 2) decreasing receptor for advanced glycation end products (RAGE), a protein involved in amyloid influx, and 3) reducing matrix metalloproteinase (MMP)-9, a member of extracellular matrix enzymes which degrade junction proteins and modify the permeability of the BBB (Zhao et al., 2015).

Trans ϵ -viniferin

Trans ϵ -viniferin is a *trans*-resveratrol dimer, notably found in *Vitis vinifera* grapevines and in wines. Only two *in vivo* studies concerning its effects on AD are described in the literature. The first evaluated its beneficial effects on memory loss, by using a methanol extract from the leaf and stem of *Vitis amurensis*, which notably contained *trans* ϵ -viniferin. Memory loss induced by intracerebroventricular injection with A β_{25-35} in mice was inhibited by chronic treatment for 7 days with this extract at the concentrations of 50 and 100 mg/kg *per os* (Jeong et al., 2010).

More recently, purified *trans* ϵ -viniferin was tested in our lab, on a mouse transgenic model of AD. APP^{swe}PS1^{dE9} mice were treated by weekly intraperitoneal injection of this stilbene at the dose of 10 mg/kg or its vehicle from 3 to 6 months of age. This treatment decreased amyloid deposits, astrogliosis and microglial activation, evaluated by immunofluorescence using W0-2, glial fibrillary acidic protein and Iba-1 respectively, in the brain of mice, reflecting a preventive role for this polyphenol (Caillaud et al., 2019).

Gnetin C

To our knowledge, no *in vivo* study was described in the literature.

Miyabenol C

Miyabenol C is a *trans*-resveratrol trimer which can be isolated from the stem and leaf extracts of the small-leaf grape *Vitisthunbergii* var. *taiwaniana*. Its beneficial effects on 12-month-old transgenic APP/PS1 mice by intracerebroventricular injection at the dose of 0.6 μ g/g into the lateral ventricle for three days (Hu et al., 2015). This treatment with miyabenol C treatment induced reduction of soluble β -fragment of amyloid precursor protein and a reduction of both soluble toxic A β_{42} and A β_{40} levels, in cortex and hippocampus without modification of insoluble A β_{42} nor A β_{40} levels (Hu et al., 2015).

Trans-piceid

To our knowledge, no *in vivo* study was described in the literature.

Piceatannol = Astringenin

Piceatannol, also named astringenin, is a metabolite of *trans*-resveratrol, especially found in red wine, grapes, or white tea. *in vivo* effects of this hydroxide of *trans*-resveratrol for AD have been described in only one study (Hassaan et al., 2014), in which AD was induced in adult male Swiss albino mice by unique intraperitoneal injection of LPS at the dose of 0.8 mg/kg. Authors showed that treatment of these mice by daily intraperitoneal injection of piceatannol at 2.5 mg/kg for 6 days ameliorated cognitive status, evaluated by Y maze and object recognition. Moreover, A β_{42} concentration was significantly reduced in the brain of animals that were treated by this stilbene (Hassaan et al., 2014).

Astringin

No study describing effects of this stilbene, neither *in vitro* nor *in vivo*, was published to our knowledge.

Pterostilbene

Pterostilbene is a naturally-derived stilbenoid structurally related to resveratrol. It was initially isolated from sandalwood, but is also found in fruits, such as grapes and blueberries.

A first *in vivo* study compared diet-achievable supplementation of *trans*-resveratrol or pterostilbene during two months to improve functional impairments and markers of AD in the SAMP8 mice (Chang et al., 2012). Authors showed that, unlike resveratrol, pterostilbene improved cognitive status, evaluated by radial arm water maze, in these mice. Moreover, it decreased markers of 1) cellular stress, such as manganese superoxide dismutase, an endogenous antioxidant defense protein, 2) inflammation such as peroxisome proliferator-activated receptor α receptor and 3) AD such as phosphorylated tau. However, neither *trans*-resveratrol nor pterostilbene increased SIRT1 expression and activation in this model of sporadic AD (Chang et al., 2012).

Another study evaluated the effects of pterostilbene on learning and memory impairment and changes of microglia and neurons induced in male C57BL/6 mice by bilaterally intrahippocampal injection of LPS (Hou et al., 2014). Pterostilbene, orally administrated at 20 or 40 mg/kg everyday from 7 days before intrahippocampal administration of LPS decreased cognitive disorders, evaluated by Y-maze and Morris water maze. Moreover, it significantly decreased the number of microglial Iba-1 positive cells and neuronal precursor doublecortin positive cells and increased neuronal nuclear antigen-stained area of neurons the hippocampus of these mice, suggesting anti-inflammatory and neuroprotective role (Hou et al., 2014).

Discussion

As described above, most studies about beneficial effects of natural stilbenes in animal models concern *trans*-resveratrol (Table 1 and Figure 2).

The other natural stilbenes are much less studied. Thus, some stilbenes, such as gnetin C (Seino et al., 2018), *trans*-piceid (Riviere et al., 2007) or piceatannol, also named

astringenin (Fu et al., 2016), are described only for their *in vitro* effects. For other, such as *trans* ϵ -viniferin (Riviere et al., 2007; Jeong et al., 2010; Richard et al., 2011, 2013; Pinho et al., 2013; Schuck et al., 2015; Vion et al., 2018) or pterostilbene (Hou et al., 2014; Fu et al., 2016; Li et al., 2016, 2018), most papers describe *in vitro* experiments and *in vivo* studies remain rare.

In the opposite, *trans*-resveratrol was largely described for its effects both *in vitro* and *in vivo*, in murine and rat models of AD. However, these encouraging results need to be confirmed in human AD. Although many clinical trials investigating the effect of *trans*-resveratrol on AD or other conditions associated with this pathology are listed in the NIH clinicaltrials.gov registry, to our knowledge, results of only one clinical study are described in the literature. In this one, mild to moderate AD patients received placebo or *trans*-resveratrol (initially 500 mg once daily with dose escalation ending with 1000 mg twice daily) during 52 weeks. Authors showed that *trans*-resveratrol and its metabolites were measurable in plasma and cerebrospinal fluid (CSF) and obviously penetrated the BBB to exert their effects. Moreover, *trans*-resveratrol was safe and well-tolerated. But results of this clinical study were ambivalent. Indeed, CSF A β_{42} and A β_{40} levels declined more in the placebo group than in the *trans*-resveratrol group. However, brain volume loss was increased in the *trans*-resveratrol treatment group (Turner et al., 2015). This same study showed that *trans*-resveratrol had effect on some inflammatory proteins. Indeed, it markedly reduced CSF matrix metalloproteinase MMP-9 and increased macrophage-derived chemokine, interleukin (IL)-4, and fibroblast growth factor 2. In the plasma, it increased MMP-10 and decreased IL-12P40, IL-12P70, and chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5). All these results suggest that *trans*-resveratrol modulated neuro-inflammation, and induced adaptive immunity. Moreover, this treatment attenuated declines evaluated by mini-mental status examination scores (Moussa et al., 2017). Indeed, a significant decrease in mini-mental status examination score was observed at 52 weeks compared to baseline in the placebo group, but no significant change was detected for this test in the *trans*-resveratrol treatment group. Alzheimer's Disease Assessment Scale-activities of daily living scores showed a decline at 52 weeks compared to control in both placebo and *trans*-resveratrol groups, but the decrease in the placebo group twice as large as that in the *trans*-resveratrol group at week 52. These results suggest that *trans*-resveratrol could slow progressive cognitive and functional decline in mild to moderate AD subjects (Moussa et al., 2017).

However, this molecule is rapidly metabolized, mainly in these glucuronidated and sulfated forms and excreted in the urine. Another natural stilbene, pterostilbene, seems more promising than *trans*-resveratrol. Indeed, methylation of the phenolic hydroxyl could limit the glucuronidation and sulfation processes of pterostilbene, because it provides less conjugating site than resveratrol, resulting in a better metabolic stability (Wang and Sang, 2018). As described above, low doses of pterostilbene, but not resveratrol, were described to

be beneficial for AD (Chang et al., 2012). Thus, pterostilbene, which is more metabolically stable and has higher pharmacological activities than resveratrol, could be interesting for clinical trials.

Author contributions: Manuscript writing: AF, BF and ARB; manuscript review: GP. All authors approved the final manuscript.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Financial support: None.

Copyright license agreement: The Copyright License Agreement has been signed by all authors before publication.

Plagiarism check: Checked twice by iThenticate.

Peer review: Externally peer reviewed.

Open access statement: This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

Open peer reviewer: Ubaldo Armato, University of Verona Medical School, Italy.

References

- Bavaresco C, Fregoni C (2001) Physiological role and molecular aspects of grapevine stilbenic compounds. In: Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine (Roubelakis-Angelakis KA, ed), pp 153-182. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Bavaresco L, Fregoni C, de Macedo Basto Gonçalves MZ, Vezzulli S (2009) Physiology & molecular biology of grapevine stilbenes: an update. In: Grapevine molecular physiology & biotechnology (Roubelakis-Angelakis KA, eds), pp341-364. Springer, Dordrecht.
- Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56:317-333.
- Caillaud M, Guillard J, Richard D, Milin S, Chassaing D, Paccalin M, Page G, Rioux Bilan A (2019) Trans epsilon viniferin decreases amyloid deposits and inflammation in a mouse transgenic Alzheimer model. *PLoS One* 14:1-12.
- Capiralla H, Vingtdoux V, Zhao H, Sankowski R, Al-Abed Y, Davies P, Marambaud P (2012) Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and Abeta-mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF-kappaB/STAT signaling cascade. *J Neurochem* 120:461-472.
- Chang J, Rimando A, Pallas M, Porquet D, Reeves J, Shukitt-Hale B, Smith MA, Joseph JA, Casadesus G (2012) Low-dose pterostilbene, but not resveratrol, is a potent neuromodulator in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33:2062-2071.
- Cheng X, Wang Q, Li N, Zhao H (2015) Effects of resveratrol on hippocampal astrocytes and expression of TNF-alpha in Alzheimer's disease model rat. *Wei Sheng Yan Jiu* 44:610-614.
- Cicero AFG, Ruscica M, Banach M (2019) Resveratrol and cognitive decline: a clinician perspective. *Arch Med Sci* 15:936-943.
- Farooqui T, Farooqui AA (2009) Aging: an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev* 130:203-215.
- Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM (1997) Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests. *Life Sci* 61:2103-2110.
- Freyssin A, Page G, Fauconneau B, Rioux Bilan A (2018) Natural polyphenols effects on protein aggregates in Alzheimer's and Parkinson's prion-like diseases. *Neural Regen Res* 13:955-961.
- Fu Z, Yang J, Wei Y, Li J (2016) Effects of piceatannol and pterostilbene against beta-amyloid-induced apoptosis on the PI3K/Akt/Bad signaling pathway in PC12 cells. *Food Funct* 7:1014-1023.
- Greenwald J, Riek R (2010) Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure* 18:1244-1260.
- Hassan Y, Handoussa H, El-Khatib AH, Linscheid MW, El Sayed N, Ayoub N (2014) Evaluation of plant phenolic metabolites as a source of Alzheimer's drug leads. *Biomed Res Int* 2014:1-10.

- Hou Y, Xie G, Miao F, Ding L, Mou Y, Wang L, Su G, Chen G, Yang J, Wu C (2014) Pterostilbene attenuates lipopolysaccharide-induced learning and memory impairment possibly via inhibiting microglia activation and protecting neuronal injury in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 54:92-102.
- Hu J, Lin T, Gao Y, Xu J, Jiang C, Wang G, Bu G, Xu H, Chen H, Zhang YW (2015) The resveratrol trimer miyabenol C inhibits beta-secretase activity and beta-amyloid generation. *PLoS One* 10:1-13.
- Huang TC, Lu KT, Wo YY, Wu YJ, Yang YL (2011) Resveratrol protects rats from Abeta-induced neurotoxicity by the reduction of iNOS expression and lipid peroxidation. *PLoS One* 6:e29102.
- Ittner LM, Gotz J (2011) Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 12:65-72.
- Jeong HY, Kim JY, Lee HK, Ha do T, Song KS, Bae K, Seong YH (2010) Leaf and stem of *Vitis amurensis* and its active components protect against amyloid beta protein (25-35)-induced neurotoxicity. *Arch Pharm Res* 33:1655-1664.
- Karuppagounder SS, Pinto JT, Xu H, Chen HL, Beal MF, Gibson GE (2009) Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 54:111-118.
- Khan H, Sureda A, Belwal T, Cetinkaya S, Suntar I, Tejada S, Devkota HP, Ullah H, Aschner M (2019) Polyphenols in the treatment of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 18:647-657.
- Li Q, Chen L, Liu X, Li X, Cao Y, Bai Y, Qi F (2018) Pterostilbene inhibits amyloid-beta-induced neuroinflammation in a microglia cell line by inactivating the NLRP3/caspase-1 inflammasome pathway. *J Cell Biochem* 119:7053-7062.
- Li Y, Jiang X, Hao J, Zhang Y, Huang R (2019) Tea polyphenols: application in the control of oral microorganism infectious diseases. *Arch Oral Biol* 102:74-82.
- Li Y, Qiang X, Yang X, Luo L, Xiao G, Cao Z, Tan Z, Deng Y (2016) Pterostilbene-O-acetamidalkylbenzylamines derivatives as novel dual inhibitors of cholinesterase with anti-beta-amyloid aggregation and antioxidant properties for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem Lett* 26:2035-2039.
- Mietelska-Porowska A, Wasik U, Goras M, Filipek A, Niewiadomska G (2014) Tau protein modifications and interactions: their role in function and dysfunction. *Int J Mol Sci* 15:4671-4713.
- Moussa C, Hebron M, Huang X, Ahn J, Rissman RA, Aisen PS, Turner RS (2017) Resveratrol regulates neuro-inflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 14:1-10.
- Patterson C (2018) World Alzheimer Report 2018. The state of the art of dementia research: New frontiers. In, *Alzheimer's Disease International Edition*, pp 1-48.
- Petrovski G, Gurusamy N, Das DK (2011) Resveratrol in cardiovascular health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1215:22-33.
- Pinho BR, Ferreres F, Valentao P, Andrade PB (2013) Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibitory activity: an approach to Alzheimer's disease treatment. *J Pharm Pharmacol* 65:1681-1700.
- Porquet D, Casadesus G, Bayod S, Vicente A, Canudas AM, Vilaplana J, Pelegri C, Sanfeliu C, Camins A, Pallas M, del Valle J (2013) Dietary resveratrol prevents Alzheimer's markers and increases life span in SAMP8. *Age (Dordr)* 35:1851-1865.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegur L (2011) Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 50:586-621.
- Richard T, Papastamoulis Y, Waffo-Teguo P, Monti JP (2013) 3D NMR structure of a complex between the amyloid beta peptide (1-40) and the polyphenol epsilon-viniferin glucoside: implications in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1830:5068-5074.
- Richard T, Poupard P, Nassra M, Papastamoulis Y, Iglesias ML, Krisa S, Waffo-Teguo P, Merillon JM, Monti JP (2011) Protective effect of epsilon-viniferin on beta-amyloid peptide aggregation investigated by electrospray ionization mass spectrometry. *Bioorg Med Chem* 19:3152-3155.
- Riviere C, Pawlus AD, Merillon JM (2012) Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Nat Prod Rep* 29:1317-1333.
- Riviere C, Richard T, Quentin L, Krisa S, Merillon JM, Monti JP (2007) Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Bioorg Med Chem* 15:1160-1167.
- Rodríguez-García C, Sánchez-Quesada C, J Gaforio J (2019) Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: an updated review of human studies. *Antioxidants (Basel)* doi: 10.3390/antiox8050137.
- Schuck F, Schmitt U, Reinhardt S, Freese C, Lee IS, Thines E, Efferth T, Endres K (2015) Extract of *Caragana sinica* as a potential therapeutic option for increasing alpha-secretase gene expression. *Phytomedicine* 22:1027-1036.
- Seino S, Kimoto T, Yoshida H, Tanji K, Matsumiya T, Hayakari R, Seya K, Kawaguchi S, Tsuruga K, Tanaka H, Imaizumi T (2018) Gnetin C, a resveratrol dimer, reduces amyloid-beta 1-42 (Abeta42) production and ameliorates Abeta42-lowered cell viability in cultured SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biomed Res* 39:105-115.
- Shen T, Wang XN, Lou HX (2009) Natural stilbenes: an overview. *Nat Prod Rep* 26:916-935.
- Silva P, Sureda A, Tur JA, Andreoletti P, Cherkaoui-Malki M, Latruffe N (2019) How efficient is resveratrol as an antioxidant of the Mediterranean Diet, towards alterations during the aging process? *Free Radic Res* 1:1-311.
- Sirerol JA, Rodriguez ML, Mena S, Asensi MA, Estrela JM, Ortega AL (2016) Role of natural stilbenes in the prevention of cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2016:1-15.
- Szkudelska K, Szkudelski T (2010) Resveratrol, obesity and diabetes. *Eur J Pharmacol* 635:1-8.
- Szkudelski T, Szkudelska K (2015) Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *Biochim Biophys Acta* 1852:1145-1154.
- Tellone E, Galtieri A, Russo A, Giardina B, Ficarra S (2015) Resveratrol: a focus on several neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2015:1-14.
- Thomasset SC, Berry DP, Garcea G, Marczylo T, Steward WP, Gescher AJ (2007) Dietary polyphenolic phytochemicals--promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. *Int J Cancer* 120:451-458.
- Turner RS, Thomas RG, Craft S, van Dyck CH, Mintzer J, Reynolds BA, Brewer JB, Rissman RA, Raman R, Aisen PS (2015) A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. *Neurology* 85:1383-1391.
- Varamini B, Sikalidis AK, Bradford KL (2014) Resveratrol increases cerebral glycogen synthase kinase phosphorylation as well as protein levels of drebrin and transthyretin in mice: an exploratory study. *Int J Food Sci Nutr* 65:89-96.
- Vingtdeux V, Giliberto L, Zhao H, Chandakkar P, Wu Q, Simon JE, Janle EM, Lobo J, Ferruzzi MG, Davies P, Marambaud P (2010) AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *J Biol Chem* 285:9100-9113.
- Vion E, Page G, Bourdeaud E, Paccalin M, Guillard J, Rioux Bilan A (2018) Trans epsilon-viniferin is an amyloid-beta disaggregating and anti-inflammatory drug in a mouse primary cellular model of Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci* 88:1-6.
- Wang P, Sang S (2018) Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. *Biofactors* 44:16-25.
- Zhao H, Niu Q, Li X, Liu T, Xu Y, Han H, Wang W, Fan N, Tian Q, Zhang H, Wang Z (2012) Long-term resveratrol consumption protects ovariectomized rats chronically treated with D-galactose from developing memory decline without effects on the uterus. *Brain Res* 1467:67-80.
- Zhao HF, Li N, Wang Q, Cheng XJ, Li XM, Liu TT (2015) Resveratrol decreases the insoluble Abeta1-42 level in hippocampus and protects the integrity of the blood-brain barrier in AD rats. *Neuroscience* 310:641-649.

P-Reviewer: Armato U; C-Editors: Zhao M, Li JY; T-Editor: Jia Y

2.3.1 Le métabolisme du resvératrol

Le resvératrol, très étudié depuis de nombreuses années pour ses propriétés antioxydantes, a largement été utilisé *in vitro* (Gambini et al., 2015 ; Gescher and Steward, 2003). Cependant ses effets n'ont jamais pu être clairement décrits *in vivo*. Cela serait en partie dû à une faible biodisponibilité du resvératrol, bien que celle-ci fut très peu étudiée jusque dans les années 2000. La première évaluation de la biodisponibilité du resvératrol fut décrite en 1998, lorsque Bertelli et son équipe montrèrent que le resvératrol, administré par voie orale, était rapidement absorbé avec l'apparition d'un pic plasmatique après 30 minutes chez le rat (Bertelli et al., 1998). Par la suite, l'étude de la biodisponibilité du resvératrol marqué au carbone 14 a mis en évidence ce stilbène dans les poumons, les reins, le foie, le colon, le cœur, les testicules et le cerveau de souris (Vitrac et al., 2003). Il faudra attendre 2003 pour que la première étude de la biodisponibilité du resvératrol soit menée chez l'Homme. Avec une seule dose orale de 25 mg de resvératrol correspondant à une consommation modérée de vin rouge, des quantifications ont estimé approximativement une concentration plasmatique maximale de resvératrol inférieure à 10 ng/mL, 30 minutes à 2 heures après l'ingestion. En revanche, les concentrations plasmatiques estimées de resvératrol métabolisé étaient beaucoup plus élevées, autour de 400 à 500 ng/mL, indiquant une très faible biodisponibilité orale pour le resvératrol (Goldberg et al., 2003). Il a été récupéré dans les urines presque toute la dose administrée (dose unique par voie orale de 25 mg). Une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a ainsi permis d'identifier trois voies métaboliques, la biotransformation par sulfoconjugaison ou par glucuroconjugaison des groupes phénoliques du resvératrol, ainsi que l'hydrogénation de la double liaison aliphatique probablement produite par la microflore intestinale (Walle et al., 2004). Burkon et Samoza identifièrent et quantifièrent cinq métabolites du resvératrol chez l'Homme dans les plasmas et urines par chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse suivie d'une analyse en RMN (résonance magnétique nucléaire). Ces métabolites sont des formes glucuroconjuguées et sulfoconjuguées du resvératrol et du dihydroxyresvératrol (Burkon and Somoza, 2008). Une fois absorbé par l'organisme, le resvératrol serait donc fortement métabolisé.

Des métabolites du resvératrol sont connus et étudiés pour leurs activités biologiques (**figure 23**).

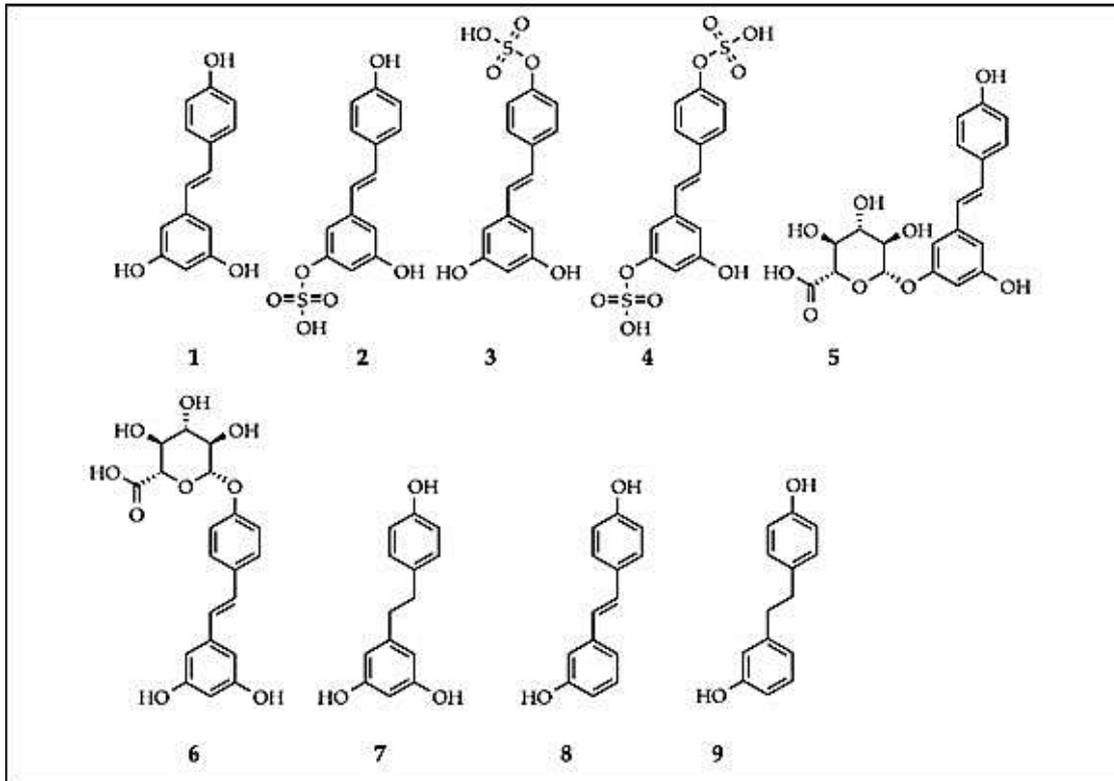


Figure 23 : Le resvératrol et ses métabolites

- (1) *trans*-resvératrol ; (2) *trans*-resveratrol-3-*O*-sulfate ; (3) *trans*-resveratrol-4'-*O*-sulfate ;
 (4) *trans*-resveratrol-3,4'-*O*-disulfate ; (5) *trans*-resveratrol-3-*O*-glucuronide ;
 (6) *trans*-resveratrol-4'-*O*-glucuronide ; (7) dihydroresveratrol (DHR) ;
 (8) 3,4'-*O*-dihydroxy-*trans*-stilbene ; (9) lunularin

(Springer and Moco, 2019)

En effet, ces métabolites peuvent inhiber l'enzyme de la cyclooxygénase (COX), qui catalyse la formation de prostaglandines, de lipides bioactifs avec effets hormonaux et de l'enzyme détoxifiante quinone réductase 2 (QR2). De plus SIRT1, une protéine enzymatique humaine, codée par le gène *SIRT1* et correspondant à une lysine désacétylase dépendante du coenzyme NAD⁺ peut également être activée par le resvératrol et ses métabolites, mais l'activation semble être dépendante du substrat (Springer and Moco, 2019).

Les métabolites du resvératrol pourraient donc contribuer à une grande variété d'actions, mais aucun effet de ceux-ci n'a été décrit dans le cadre de la MA.

Une approche logique pour améliorer les effets bénéfiques limités du resvératrol dans la MA, en raison de sa faible biodisponibilité, pourrait donc être de synthétiser des dérivés plus stables ou d'évaluer les effets de dérivés naturels du resvératrol dont la structure les rend métaboliquement plus stables.

2.3.2 La *trans* ϵ -viniférine

Plusieurs chercheurs ont étudié les effets de la *trans* ϵ -viniférine (nommée dans la suite du manuscrit viniférine) (**figure 24**), un dimère du resvératrol qui pourrait posséder des propriétés supérieures à celles du resvératrol tout en étant moins rapidement métabolisé.

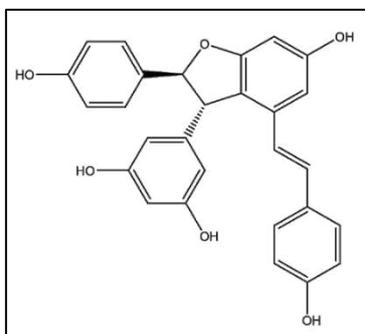


Figure 24 : Structure chimique de la *trans* ϵ -viniférine

Ce stilbène d'origine naturelle est présent dans la vigne d'espèce *Vitis vinifera*, dans le vin, les sarments de la vigne et également dans l'écorce de *Dryobalanops aromatica*, un arbre originaire de Malaisie (Wibowo et al., 2011). Dès 2003 la viniférine a été décrite comme étant inhibitrice de certains cytochromes impliqués dans l'activation de substances cancérigènes, avec une efficacité d'action supérieure à celle du le resvératrol (Piver et al., 2003). De plus, la viniférine, de façon plus efficace que le resvératrol, améliore *in vitro* les fonctions des cellules endothéliales vasculaires et cardiaques, mais possède aussi un effet anti-inflammatoire et anti obésogène plus efficace dans les cellules 3T3-L1 de type adipocyte (Ohara et al., 2015 ; Zghonda et al., 2012). Enfin, dans le cadre de la MA, il a été montré que la viniférine inhibait *in vitro* l'agrégation du peptide A β avec une efficacité supérieure à celle du resvératrol (Richard et al., 2011 ; Rivière et al., 2010). Il y a quelques années au laboratoire, cette capacité à inhiber l'agrégation du peptide A β_{1-42} a aussi été mise en évidence par microscopie à balayage, mais il a été également montré que la viniférine, à la concentration de 1 μ M, induisait une désagrégation plus importante du peptide A β_{1-42} préalablement agrégé, avec une efficacité supérieure à celle du resvératrol (**figure 25**) (Vion et al., 2018).

De plus, il a été montré que, dans un modèle *in vitro* de la MA, constitué d'une culture primaire de neurones, d'astrocytes et de microglie traitée par du peptide A β_{1-42} préalablement agrégé et de l'IL-1 β reproduisant le contexte inflammatoire, la viniférine avait un effet anti-inflammatoire supérieur à celui du resvératrol, se traduisant par une sécrétion moindre des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α (**figure 26**) (Vion et al., 2018).

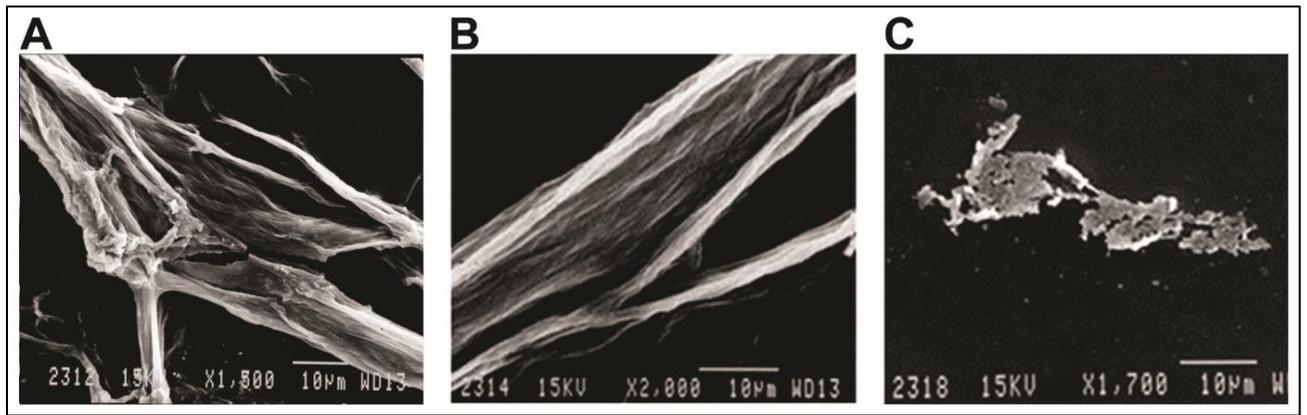


Figure 25 : Effets du resvératrol (B) et de la trans ϵ -viniférine (C) sur la désagrégation du peptide $A\beta_{1-42}$ préalablement agrégé (A)

(Vion et al., 2018)

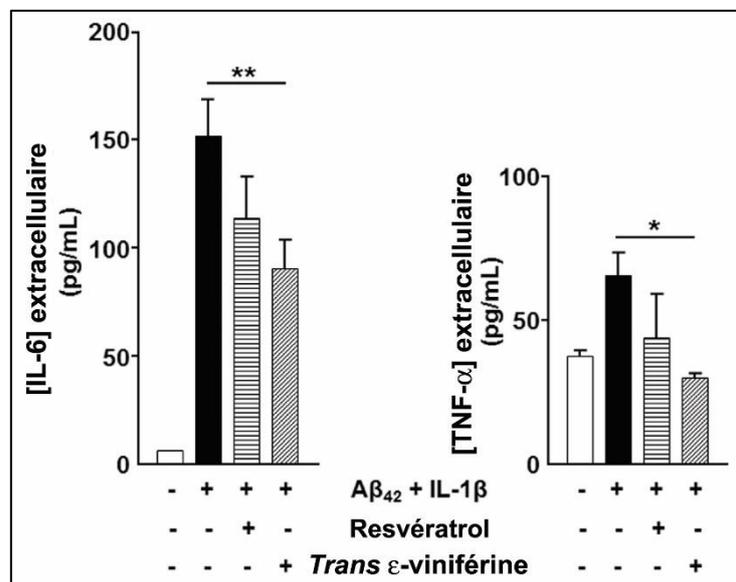


Figure 26 : Effets anti-inflammatoires du resvératrol et de la trans ϵ -viniférine dans un modèle cellulaire de la MA

D'après (Vion et al., 2018)

Cette étude *in vitro* semblait ainsi montrer que la viniférine est donc une molécule ayant plusieurs activités bénéfiques ciblant plusieurs aspects de la MA. Ces résultats *in vitro* particulièrement prometteurs ont conduit l'équipe à étudier les effets de la viniférine dans un modèle murin de la MA, les souris transgéniques APP^{swe}PS1^{dE9}. Ces souris commencent à développer des dépôts amyloïdes accompagnés d'une neuroinflammation entre 4 et 6 mois.

Dans cette première étude *in vivo*, 13 souris Alzheimer (mâles et femelles) ont reçu de l'âge 3 mois jusqu'à 6 mois une injection intrapéritonéale hebdomadaire de viniférine à la concentration de 10 mg/kg (n=9) ou son véhicule (n=4), le polyéthylène glycol 200 (PEG 200). L'analyse du

cerveau de ces souris par des techniques d'immunomarquages et de biochimie a montré que le traitement par la viniférine avait conduit à une réduction de la taille et de la densité des dépôts amyloïdes dans le cortex et l'hippocampe alors que la charge amyloïde globale quantifiée par ELISA n'était pas modifiée. De plus, la viniférine semblait réduire l'expression de GFAP et d'IBA-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), deux protéines permettant de détecter les astrocytes et la microglie, respectivement. Par ailleurs, les techniques d'immunofluorescence ont permis de visualiser une diminution de l'hypertrophie astrocytaire dans le cerveau des souris traitées par la viniférine par rapport aux souris traitées par le véhicule. Ces résultats suggèrent une inhibition de l'agrégation du peptide amyloïde sous forme de dépôts amyloïdes ou une désagrégation de ces derniers, accompagnée d'une diminution du phénomène inflammatoire, bien que celui-ci reste modéré à l'âge de 6 mois dans ce modèle (Caillaud et al., 2019).

Cette étude *in vivo* semblait donc montrer un effet partiellement préventif de la viniférine dans ce modèle murin de la MA. Toutefois, cette étude avait des limites. En effet, le nombre de souris demeurait faible. Ces souris n'étaient pas comparées à des souris traitées par le polyphénol de référence, le resvératrol, ni à des souris sauvages de même fond génétique. De plus, ces résultats ne nous donnaient aucune information sur les éventuels effets curatifs de la viniférine ni sur son rôle sur le plan cognitif. De même l'effet d'une administration prolongée demeurait inconnue.

Objectifs

« Dans le contexte précédemment évoqué, mon travail de thèse a comporté 3 volets, menés en parallèle, distincts mais complémentaires ».

1 Volet 1

Le premier volet avait pour objectif de comparer les effets du resvératrol et de la viniférine, chez des souris APP^{swePS1dE9} et sauvages, injectés une fois par semaine par voie i.p. **de 7 à 11 mois** (à la dose de 20 mg / kg, véhicule PEG 200 1,67 mL/kg dans NaCl 0,9 %), à la fois sur les dépôts amyloïdes, la neuroinflammation et le déclin mnésique (article 1).

A l'âge de 7 mois, les dépôts amyloïdes et une légère inflammation sont déjà présents. Le but de cette étude était donc d'évaluer la capacité de ces polyphénols à ralentir l'évolution de la maladie et / ou avoir un effet curatif.

Cette étude a été menée en collaboration avec le Dr Sylvie Chalon et ses collaborateurs (Unité Inserm U1253 ibrain, Tours), ce qui a permis une analyse par imagerie TEP-scan des dépôts amyloïdes et de l'activation microgliale ainsi qu'une corrélation au point final des paramètres quantifiés *in vivo* et *ex vivo* après euthanasie des animaux.

Cette étude a comporté les analyses suivantes (**figure 27**) :

- Evaluation du déclin mnésique par comparaison des capacités mnésiques (mémoire spatiale) au début et à la fin du traitement. Cette étude comportementale a été effectuée grâce la piscine de Morris ou water maze (WM) (cf partie méthodologie 1.6)
- Analyse par imagerie TEP-scan sur petit animal des dépôts amyloïdes et de la neuroinflammation par marquage au [¹⁸F]Florbetaben et au [¹⁸F]DPA-714 respectivement (cf partie méthodologie partie 1.7)
- Mise en évidence par immunofluorescence (IF) des dépôts amyloïdes hippocampiques par immunomarquage avec l'anticorps W02
- Quantification par ELISA de la charge amyloïde globale hippocampique (A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂, soluble et insoluble)
- Quantification par western blot de l'expression hippocampique du fragment C99 de l'APP, généré par l'action de la β -sécrétase

- Mise en évidence par immunofluorescence des principaux acteurs cellulaires de l'inflammation au niveau de l'hippocampe par immunomarquage avec des anticorps dirigés contre GFAP (astrocytes) et IBA1 (microglie)
- Quantification par western blot de l'expression hippocampique de GFAP et d'IBA1

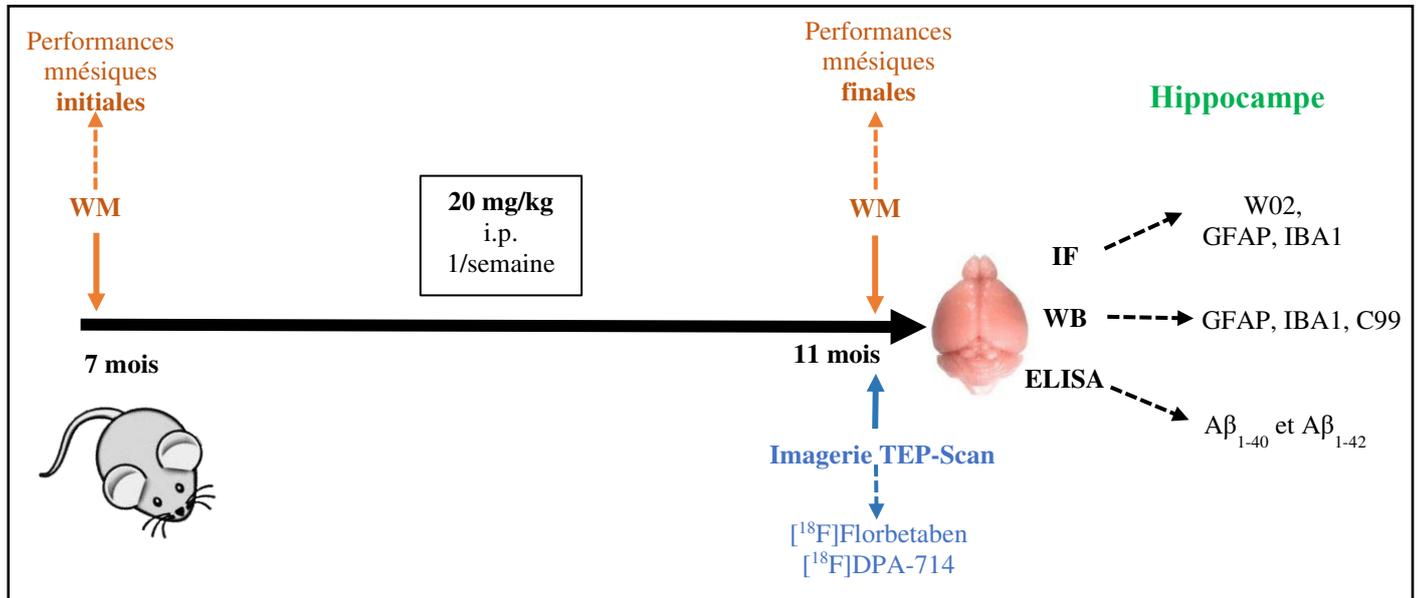


Figure 27 : Chronologie du Volet 1

2 Volet 2

Le deuxième volet avait pour objectif de comparer les effets du resvératrol et de la viniférine, chez des souris APPswePS1dE9 et sauvages, injectés une fois par semaine par voie i.p. **de 3 à 12 mois** (à la dose de 20 mg / kg, véhicule PEG 200 1,67 mL/kg dans NaCl 0,9 %), à la fois sur les dépôts amyloïdes, la neuroinflammation et le déclin mnésique.

A l'âge de 3 mois, les dépôts amyloïdes et la neuroinflammation ne sont pas encore visibles. Le but de cette étude était donc d'évaluer la capacité des polyphénols à prévenir ou ralentir l'évolution de la maladie par un traitement chronique durant une longue période (9 mois de traitement).

Cette étude a comporté les analyses suivantes (**figure 28**) :

- Evaluation du déclin mnésique par comparaison des capacités mnésiques (mémoire spatiale) au début (3 mois), au milieu (6 mois) et à la fin du traitement (12 mois). Cette étude comportementale a été effectuée grâce au WM (cf partie méthodologie 1.6)

- Mise en évidence par immunofluorescence des dépôts amyloïdes au niveau de l'hippocampe par immunomarquage avec l'anticorps W02
- Mise en évidence par immunofluorescence des principaux acteurs cellulaires de l'inflammation au niveau de l'hippocampe par immunomarquage avec des anticorps dirigés contre GFAP (astrocytes) et IBA1 (microglie)

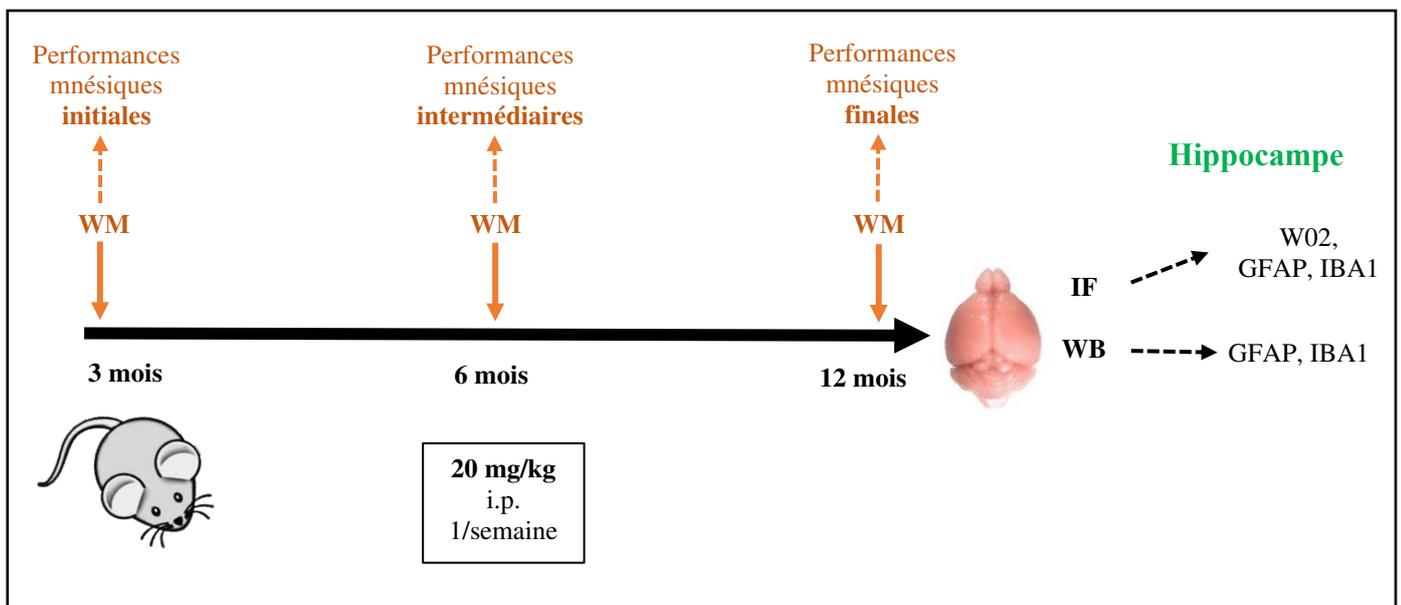


Figure 28 : Chronologie du Volet 2

3 Volet 3

Le troisième volet avait pour objectif de comparer les effets *in vitro* de différents polyphénols sur le métabolisme de l'APP, dans un modèle cellulaire de la MA, la lignée SH-SY5Y surexprimant l'APP695^{swe}.

Les différents polyphénols qui ont été testés sont la viniférine, le resvératrol, la gnétine C, l'EGCG, la myricétine et la quercétine.

Cette étude a comporté les analyses suivantes (**figure 29**) :

- Quantification par western blot de l'expression des différentes sécrétases :
 - ADAM10, enzyme ayant une activité d' α -sécrétase
 - BACE1, enzyme ayant une activité de β -sécrétase

- Quantification par western blot de l'expression des produits résultant de l'activité des sécrétases :
 - Fragment C83 de l'APP, généré par l'action de l' α -sécrétase dans la voie non-amyloïdogène
 - Fragment C99 de l'APP, généré par l'action de la β -sécrétase dans la voie amyloïdogène
 - NOTCH1 clivé, généré par l'action de la γ -sécrétase sur le récepteur transmembranaire NOTCH1
- Quantification de l'activité des différentes sécrétases intervenant dans le métabolisme de l'APP par des kits enzymatiques commerciaux, utilisant des substrats spécifiques :
 - Activité de l' α -sécrétase
 - Activité de la β -sécrétase

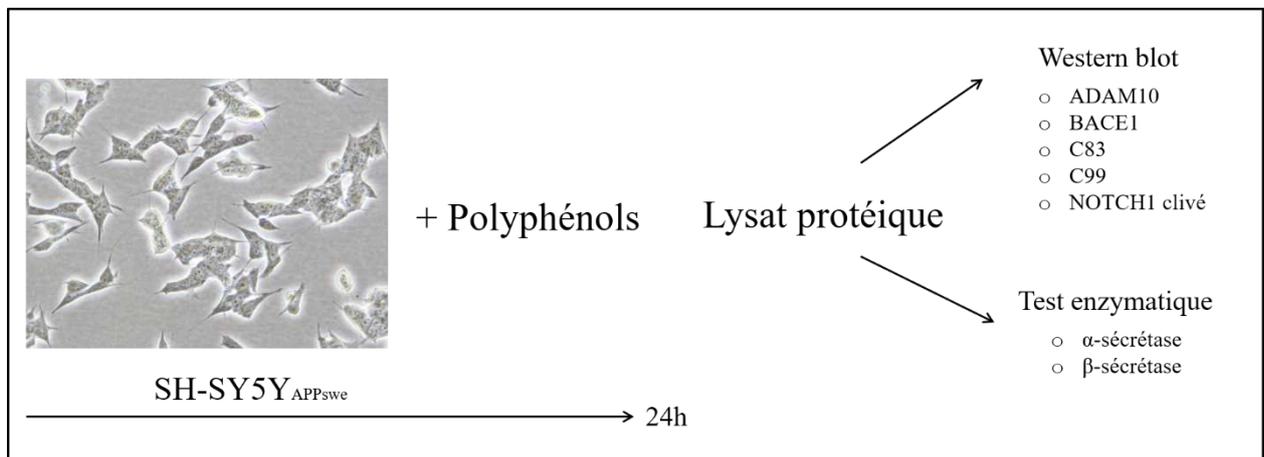


Figure 29 : Chronologie du Volet 3

Méthodologie

1 Etude *in vivo*

Dans ces deux volets, une dose hebdomadaire de viniférine (20 mg/kg), de resvératrol (20 mg/kg) ou du même volume de véhicule le PEG 200 dilué dans du NaCl 0,9 % (correspondant à 1,67 mL/kg) a été administrée par injection i.p. **de 7 mois à 11 mois (volet 1)** et **de 3 à 12 mois (volet 2)** aux souris Alzheimer APP^{swe}PS1^{dE9} et aux souris sauvages de même fond génétique B6C3F1.

1.1 Polyphénols utilisés : le resvératrol et la *trans* ϵ -viniférine

Le resvératrol et la *trans* ϵ -viniférine ont été fournis par le Pr Jérôme Guillard (IC2MP, UMR CNRS 7285, Poitiers). Ces deux polyphénols ont été extraits de sarments de vigne (*Vitis vinifera*) grâce à un éco-procédé breveté (Brevet n°WO2010063980). Leur séparation et leur purification ont été réalisées sur colonne chromatographique de silice grâce à un éluant ternaire et la pureté évaluée en RMN du proton et par microanalyse.

1.2 Modèle murin de la MA : les souris transgéniques APP^{swe}PS1^{dE9}

Ce modèle transgénique murin de la MA exprime le gène *APP* humain, portant la double mutation suédoise sur l'exon 16 et le gène *PS1* humain, comportant une délétion totale de l'exon 9, sous le contrôle du promoteur souris PrP (Prion Protein) exprimé exclusivement dans les neurones. (Jankowsky et al., 2004). Ces mutations sont associées à une apparition précoce de la MA. Le transgène humanisé *APP* permet la sécrétion de peptide A β humain et l'expression de *PS1* humain mutant augmente la quantité de peptide A β produit par le transgène APP^{swe} en favorisant le catabolisme amyloïdogène de l'APP par les β - et γ -sécrétases. Dans ce modèle, un dépôt cérébral d'A β apparaît dès 4 mois et une augmentation progressive du nombre de plaques et des concentrations d'A β se poursuit jusqu'à la mort de l'animal (Garcia-Alloza et al., 2006). De plus, des regroupements de microglie et d'astrocytes associés aux plaques amyloïdes apparaissent entre 4 et 6 mois. Cette neuroinflammation précoce de la MA augmente avec l'âge (Ruan et al., 2009). Ce modèle présente également un déficit mnésique observé dès l'âge de 12 mois par rapport aux souris sauvages de même fond génétique. L'ensemble de ces caractéristiques (plaques amyloïdes, neuroinflammation et déclin mnésique) sont exacerbés avec l'âge et deviennent prépondérants entre 12 et 18 mois (Savonenko et al., 2005 ; Xiong et al., 2011) (**figure 30**).

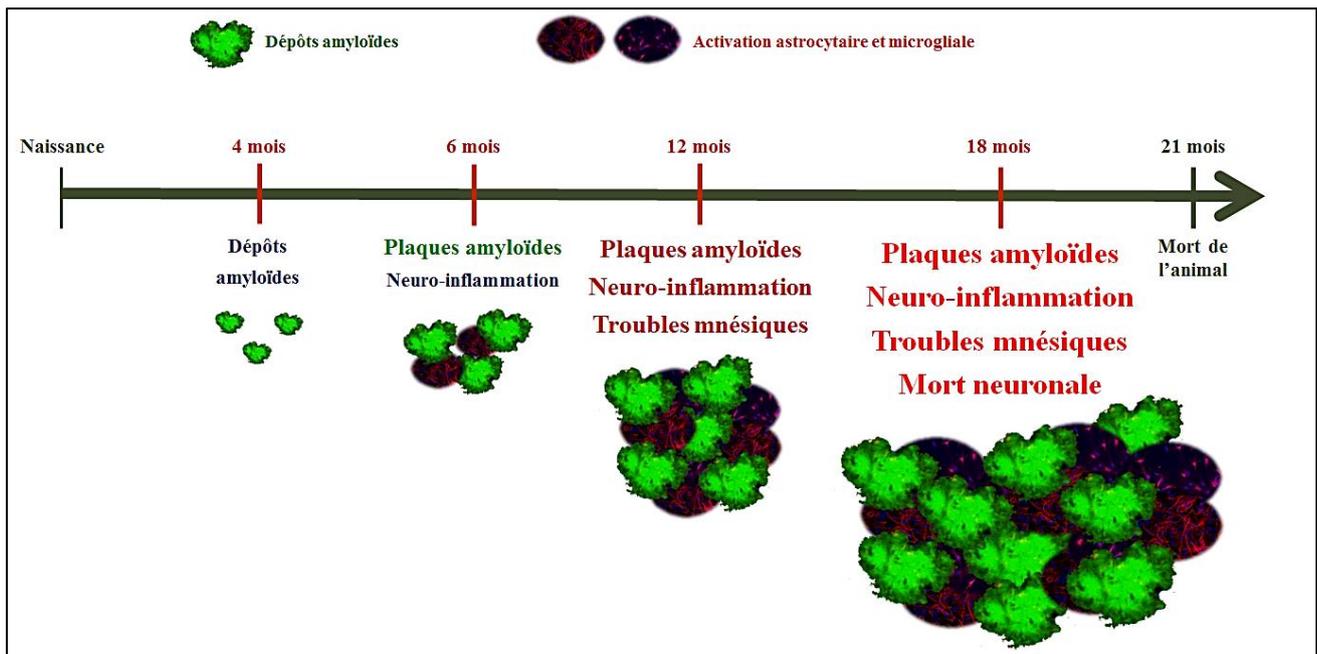


Figure 30 : Chronologie des principales lésions histopathologiques et symptômes dans le modèle transgénique murin APPswePS1dE9 de la MA

1.3 Reproduction des animaux

Ce modèle animal de la MA étant très onéreux, le recours à la reproduction en animalerie s'est avéré être la meilleure alternative pour travailler sur un nombre d'animaux conséquent. Ainsi, des souris sauvages (contrôles) et hétérozygotes APPswePS1dE9 (phénotype Alzheimer) ont été obtenues en croisant des souris mâles hétérozygotes APPswePS1dE9 (Provenance : Jackson laboratory, MMRRC Stock No : 34832-JAX) et des souris femelles sauvages de fond génétique B6C3F1 (Provenance : Charles River, souche Code 031). L'utilisation de mâles hétérozygotes et de femelles sauvages pour la reproduction s'est avérée indispensable, en raison d'un cannibalisme exacerbé des femelles hétérozygotes APPswePS1dE9 vis-à-vis de leur progéniture et du phénotype non viable des souris homozygotes APPswePS1dE9. Dans ces 2 études, une dizaine de couples reproducteurs ont été utilisés et suivis par le Pr Guylène Page tout au long de la thèse. L'utilisation de ces animaux a été approuvée par le Comité d'éthique et de protection des animaux (N°84 COMETHEA (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale) Poitou-Charentes, France) et par le ministère français (numéro d'agrément : 2015072717461531). L'utilisation de souris des deux sexes dans l'ensemble de l'étude *in vivo* a été volontaire, dans le but d'évaluer un éventuel effet sexe sur les propriétés des polyphénols.

Traitement	PEG	Resvératrol	Viniférine
Souris APPswePS1dE9	n = 4 ♂ + 5 ♀	n = 4 ♂ + 5 ♀	n = 4 ♂ + 5 ♀
Souris sauvages	n = 4 ♂ + 4 ♀	n = 4 ♂ + 4 ♀	n = 4 ♂ + 4 ♀

Table 3 : Nombre de souris APPswePS1dE9 et sauvages utilisées par traitement dans le volet 1 (traitement de 7 à 11 mois)

Traitement	PEG	Resvératrol	Viniférine
Souris APPswePS1dE9	n = 10 ♂ + 10 ♀	n = 10 ♂ + 10 ♀	n = 10 ♂ + 10 ♀
Souris sauvages	n = 10 ♂ + 10 ♀	n = 10 ♂ + 10 ♀	n = 10 ♂ + 10 ♀

Table 4 : Nombre de souris APPswePS1dE9 et sauvages utilisées par traitement dans le volet 2 (traitement de 3 à 12 mois)

1.4 Génotypage des animaux

Un génotypage par PCR (polymerase chain reaction) sur la descendance de chaque croisement a été réalisé dans le but de déterminer le phénotype sauvage ou hétérozygote APPswePS1dE9 (Alzheimer) des souris. Pour cela, de l'ADN a été extrait à partir d'un prélèvement de queue de souris à partir de 2 semaines après la naissance. Deux couples d'amorces ont été utilisés pour la PCR. Le premier a permis d'amplifier une région du gène *PS1* et le second une région du gène *IL-2* (utilisé comme contrôle positif de l'extraction d'ADN et de la PCR) :

Amorce *IL-2* sens : 5' CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT 3'

Amorce *IL-2* antisens : 5' GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC 3'

Amorce *PS1* sens : 5' AATAGAGAACGGCAGGAGCA 3'

Amorce *PS1* antisens : 5' GCCATGAGGGCACTAATCAT 3'

Les produits de PCR ont été séparés sur gel d'agarose afin de visualiser ou non la présence du gène *PS1* dans le génome des souris (**figure 31**). La recherche du gène *APP* ne se fait pas systématiquement car celui-ci est toujours associé au gène *PS1*. En effet, ces deux transgènes sont insérés au niveau du même locus dans le chromosome 9.

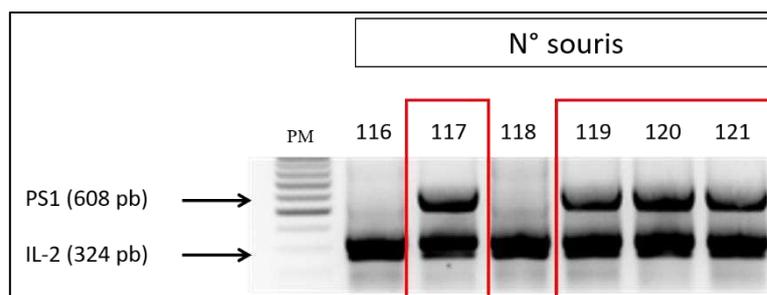


Figure 31 : Exemple de résultats d'un génotypage

Souris 116 et 118 : phénotype sauvage ; souris 117, 119, 120 et 121 : phénotype Alzheimer

1.5 Traitement des souris

Une dose hebdomadaire de 20 mg/kg de viniférine, de resvératrol, ou du même volume de véhicule (PEG 200) dilué dans du NaCl (0,9 %), a été administrée par injection par voie i.p. Des études préliminaires avaient montré une hépatotoxicité à la dose de 50 mg/kg de la viniférine lorsqu'elle était injectée par voie i.p. Cette toxicité n'a pas été retrouvée à 20 mg/kg. Cette dernière dose a donc été choisie dans le but d'augmenter les effets bénéfiques qui avaient été observés à la dose de 10 mg/kg (Caillaud et al., 2019). Un même volume de PEG 200 (véhicule utilisé pour solubiliser les polyphénols) a été administré à un groupe de souris sauvages et APP^{swe}PS1^{dE9} dans les deux volets de cette étude *in vivo*, afin de vérifier l'absence d'effet de celui-ci. Ce volume correspondait à 1,67 mL/kg. Les injections se sont déroulées chaque semaine le mardi matin en alternant le côté de l'injection (droit ou gauche).

1.6 Etude mnésique avec le test du water maze (piscine de Morris)

Afin d'étudier l'impact de la viniférine et du resvératrol sur le déclin mnésique, le test du water maze, a été utilisé. La découverte dans l'hippocampe chez le rat de « cellules de lieu », des neurones s'activant quand l'animal se trouve dans le champ récepteur qui leur est associé donc à l'origine du codage et de la récupération de la trajectoire spatio-temporelle, a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'hippocampe sous-tendrait l'élaboration d'une représentation spatiale de l'environnement sous la forme d'une carte spatiale (O'Keefe and Conway, 1978). L'élaboration de cette carte spatiale serait primordiale dans l'acquisition d'un apprentissage et d'une mémoire spatiale et est fortement perturbée dans la MA (Bromley-Brits et al., 2011). Le dispositif le plus utilisé pour évaluer cette mémoire spatiale en laboratoire est la piscine de Morris (D'Hooge and De Deyn, 2001 ; Morris et al., 1982). Ce test comportemental est réalisé dans une piscine circulaire (1 mètre de diamètre) dans laquelle se trouve une plateforme immergée (5 cm de diamètre). Le principe de l'apprentissage en piscine de Morris repose sur la motivation forcée de l'animal à

s'échapper de l'eau en rejoignant la plateforme. Cette plateforme est non visible pour l'animal grâce à l'utilisation de blanc de Meudon qui rend l'eau opaque. La souris doit donc apprendre à la localiser en formant une représentation spatiale de son environnement, grâce aux repères indicés placés autour de la piscine (**figure 32**).

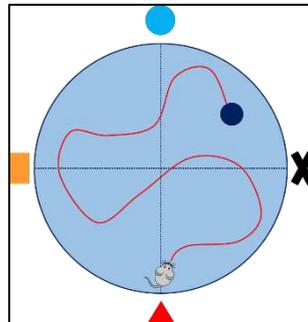


Figure 32 : Représentation et exemple de trajectoire dans la piscine de Morris avec les repères indicés autour de la piscine

Pendant 4 jours d'apprentissage, l'animal apprend à localiser la plateforme sur 4 sessions de 1 minute chacune. Pour chacune des sessions, le départ des souris se fait à partir d'un repère indicé différent autour de la piscine. Le départ suit donc une chronologie précise sur les 4 jours d'apprentissage qui est la même pour chaque souris (**figure 33**).

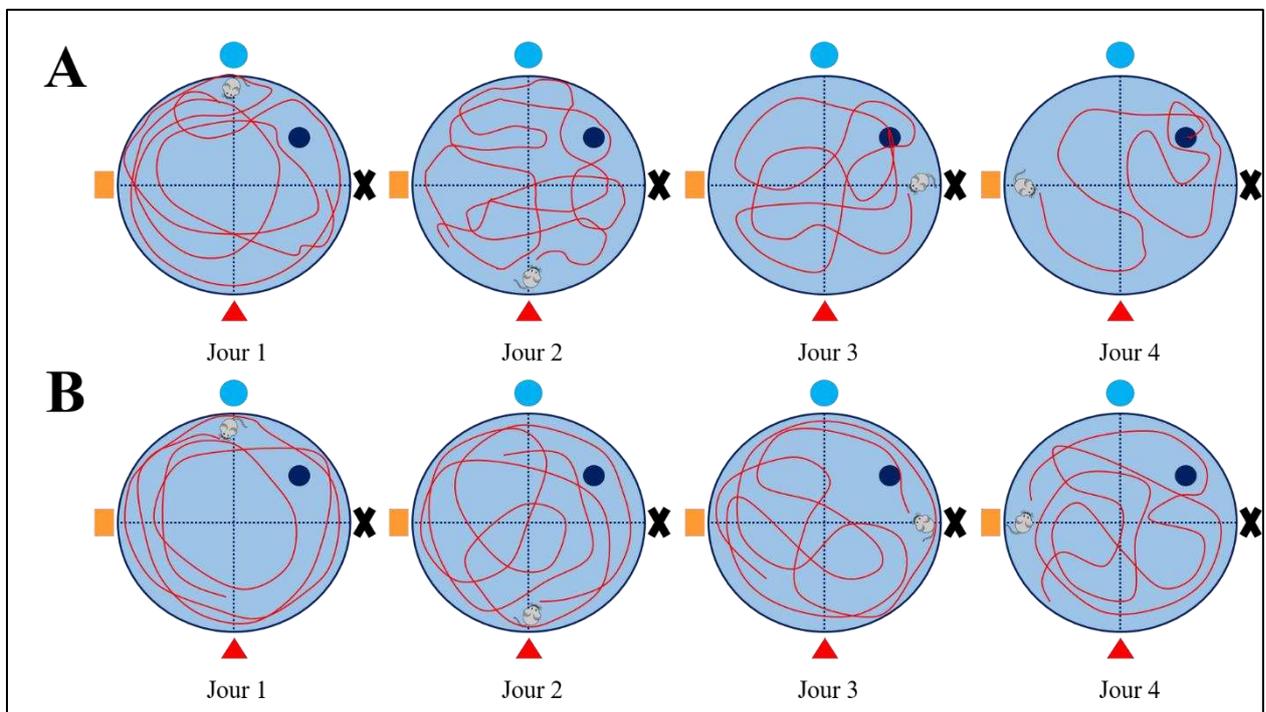


Figure 33 : Exemples d'évolution des trajectoires en piscine de Morris pendant la phase d'apprentissage

A : pour une souris ne présentant pas de trouble de l'apprentissage

B : pour une souris présentant un trouble de l'apprentissage, par exemple APPswePS1dE9

Le cinquième jour, la plateforme est retirée de la piscine et le temps de rétention, décrit comme le temps passé dans le cadran cible où la plateforme était présente en phase d'apprentissage, est mesuré sur une seule session d'1 minute (**figure 34**).

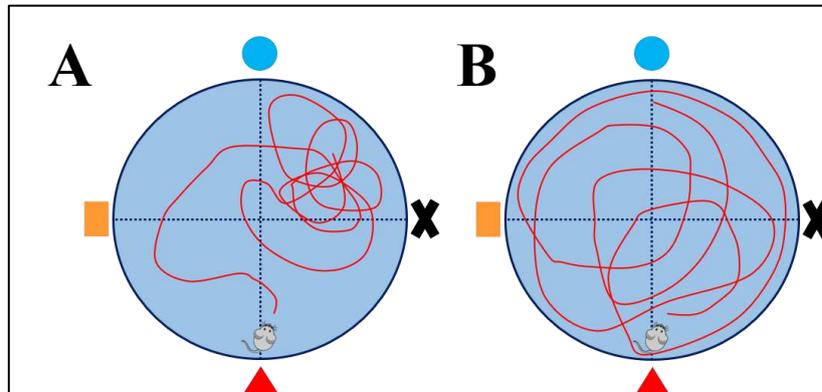


Figure 34 : Exemple de trajectoire en piscine de Morris pendant la phase de rétention

A : pour une souris ne présentant pas de trouble mnésique

B : pour une souris présentant un trouble mnésique, par exemple APPswePS1dE9

Ce test comportemental réalisé avant le début du traitement et après la dernière injection, nous a permis d'évaluer les capacités mnésiques de chaque souris au moment du test, mais également de quantifier la variation individuelle du temps de rétention entre le début et la fin du traitement, calculée par la formule suivante :

$$\text{Variation individuelle du temps de rétention} = \frac{\text{temps de rétention final} - \text{temps de rétention initial}}{\text{temps de rétention initial}}$$

Ainsi, une variation du temps de rétention inférieure à 0 témoigne d'un déclin mnésique.

Le but était de vérifier le déclin mnésique décrit dans ce modèle murin de la MA et de mettre en évidence une éventuelle diminution de ce déclin par les traitements avec les polyphénols.

Les trajectoires des animaux ont été filmées grâce à une caméra se trouvant au-dessus du dispositif. Chaque vidéo a ensuite été analysée manuellement à l'aide du logiciel Kinovea 0.7.10.

1.7 Analyse TEP-scan

L'exploration par imagerie TEP-scan sur petit animal, réalisée dans l'unité Inserm U1253 à Tours, a permis de visualiser à 11 mois les dépôts amyloïdes et un marqueur de la neuroinflammation, le TSPO (18 kDa Translocator protein) dans différentes régions du cerveau des souris APPswePS1dE9 avant leur euthanasie. Le TEP-scan, utilisé à la fois pour le diagnostic et le suivi de maladies du SNC ainsi que dans des modèles animaux de ces affections, associe l'injection d'un produit radioactif visible en imagerie et la prise d'images par un scanner. Ainsi, deux

radiotraceurs ont été utilisés dans cette étude, le [^{18}F]Florbetaben, qui permet de visualiser les dépôts amyloïdes, et le [^{18}F]DPA-714 qui cible la TSPO, un récepteur situé dans la membrane externe des mitochondries dont l'augmentation est considérée comme une caractéristique de l'activation microgliale. La TSPO est une cible pertinente pour l'imagerie de l'inflammation cérébrale car elle n'est que modérément exprimée dans le parenchyme cérébral normal, mais est considérablement augmentée lors d'un processus neuroinflammatoire (Hommet et al., 2014).



Figure 35 : μ PET SUPER ARGUS de l'unité Inserm U1253, Tours

Pour réaliser ces explorations, les souris du volet 1 ont été transportées depuis Poitiers jusqu'au laboratoire de Tours par un transporteur agréé, puis prises en charge par le Dr Sylvie Chalon et ses collaborateurs. La proximité d'un cyclotron produisant le fluor 18 associé à une structure de radiochimie dédiée à la préparation des traceurs, le centre d'études et de recherches sur les radiopharmaceutiques (CERP), permet la réalisation de l'imagerie rapidement, ce qui est indispensable car la demi-vie du fluor 18 est très courte (109,77 min). Après 1 semaine d'adaptation, chaque souris a été explorée à l'aide des 2 traceurs, avec un délai d'au moins 3 jours entre chaque étude permettant la décroissance de la radioactivité, selon le protocole décrit dans Sérrière et al. (Sérrière et al., 2015). Les animaux ont reçu une injection intraveineuse de [^{18}F]Florbetaben ou [^{18}F]DPA-714 à la dose de 15-20 MBq dans la veine caudale sous anesthésie à l'isoflurane. Une tomodesitométrie a d'abord été acquise pendant 5 min pour la correction de l'atténuation, puis les animaux ont été scannés pendant 61 min en utilisant le système PET du Super Argus. Les acquisitions TEP ont été regroupées en 33 images séquentielles et les 30 dernières minutes d'acquisition ont été extraites pour la reconstruction, puis analysées à l'aide du logiciel PMOD (3.403, PMOD Technologies, Zurich, Suisse). Ensuite, une analyse basée sur le voxel correspondant à l'intensité de chaque pixel volumétrique a été utilisée pour évaluer les différences de liaison des radiotraceurs entre les cerveaux des souris traitées selon une méthode décrite dans Nicolas et al. (Nicolas et al., 2017).

1.8 Analyses biochimiques

Plusieurs analyses biochimiques durant cette étude ont été réalisées. Toutes ces techniques de western blot, d'immunofluorescence et d'ELISA sont très utilisées en biologie et leur description a été intégrée dans les articles ci-après et donc ne seront pas détaillées dans cette partie.

2 Etude *in vitro*

Dans cette étude, divers polyphénols ont été utilisés pour rechercher leur éventuel effet sur le métabolisme de l'APP dans un modèle cellulaire de la MA. Le niveau d'expression et l'activité des différentes sécrétases impliquées dans les deux voies de dégradation de l'APP ont été quantifiés par des techniques biochimiques, le western blot et des tests enzymatiques utilisant des substrats spécifiques. Le taux d'expression des produits résultant de l'activité des sécrétases (α , β et γ) a également été évalué par western blot (C83, C99 et NOTCH1 clivé respectivement).

2.1 Polyphénols utilisés

Le resvératrol et la *trans* ϵ -viniférine, fournis par le Pr Jérôme Guillard (IC2MP, UMR CNRS 7285, Poitiers), sont les mêmes molécules que celles utilisées pour l'étude *in vivo*. La gnétine C a été gracieusement fournie et envoyée par Yasuro Suzuki de la société japonaise Hosoda SHC. La quercétine, la myricétine et l'EGCG ont été achetées chez le fournisseur Sigma-Aldrich.

2.2 Modèle SH-SY5Y_{APP^{swe}}

La lignée cellulaire de neuroblastome humain SH-SY5Y est un modèle très utilisé en neuroscience. Dans notre étude, nous avons utilisé les cellules SH-SY5Y_{APP^{swe}}, qui nous ont été gracieusement fournies par le Dr Frédéric Checler, directeur de recherche à l'institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC) à Nice. Ces cellules expriment le gène *APP695* comportant la mutation « swedish » et la protéine codée par ce gène. Cette mutation est responsable de l'augmentation de l'expression de l'APP ainsi que des niveaux d'A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂. Pour cela, les cellules SH-SY5Y ont été transfectées de manière stable avec un plasmide comportant la séquence codante de ce gène, associée à un gène de résistance à la généticine et un clone a été sélectionné grâce à cet antibiotique. Durant leur culture, l'utilisation d'une faible concentration de généticine permet de maintenir la pression de sélection.

2.3 Le traitement

Les cellules SH-SY5Y_{APP^{Swe}} ont été traitées par l'un des 6 polyphénols à la concentration de 20 μ M pendant 24 heures. Cette concentration est non toxique pour les cellules et a été choisie en fonction des données de la littérature. Le dantrolène, à la concentration de 10 et 50 μ M a été utilisé dans cette étude comme contrôle positif en tant qu'inhibiteur de la β -sécrétase. En effet, cette molécule a été décrite comme induisant une réduction du fragment C99 et de la production d'A β ₁₋₄₂ dans les cellules SH-SY5Y_{APP^{Swe}} (Oulès et al., 2012).

Seuls la viniférine et le resvératrol ont été utilisés pour étudier leurs effets sur l'activité enzymatique des α - et β -sécrétases à l'aide de kits enzymatiques utilisant des substrats spécifiques, commercialisés, par Eurogentec et Enzo life sciences respectivement.

2.4 Analyses biochimiques

Les anticorps utilisés pour révéler le niveau d'expression des sécrétases ADAM 10 et BACE 1, ainsi que celui de leurs produits d'activité sont répertoriés dans la **table 5**.

<i>Anticorps</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Référence</i>	<i>Dilution</i>
ADAM10	Cell signaling	14194	1/500
BACE1	Ozyme	5606S	1/1000
C83	Sigma-Aldrich	A8717	1/1000
C99	Sigma-Aldrich	A18717	1/1000
NOTCH1 clivé	Cell signaling	3608S	1/1000

Table 5 : Liste des anticorps utilisés dans l'étude in vitro

Le principe des kits enzymatiques pour mesurer l'activité des sécrétases est le suivant : le substrat synthétique, dont la séquence est reconnue spécifiquement par la sécrétase étudiée, est marqué à ses deux extrémités par deux fluorochromes, appelés EDANS et DABCYL. Lorsque le substrat n'est pas clivé, la fluorescence d'EDANS n'est pas émise à 495 nm (longueur d'onde de détection) en raison de la proximité du fluorochrome DABCYL. Le clivage du substrat par la sécrétase conduit à une séparation physique d'EDANS et de DABCYL, permettant l'émission de la fluorescence du fluorochrome EDANS. L'intensité de fluorescence émise est proportionnelle à l'activité de la sécrétase (**figure 36**).

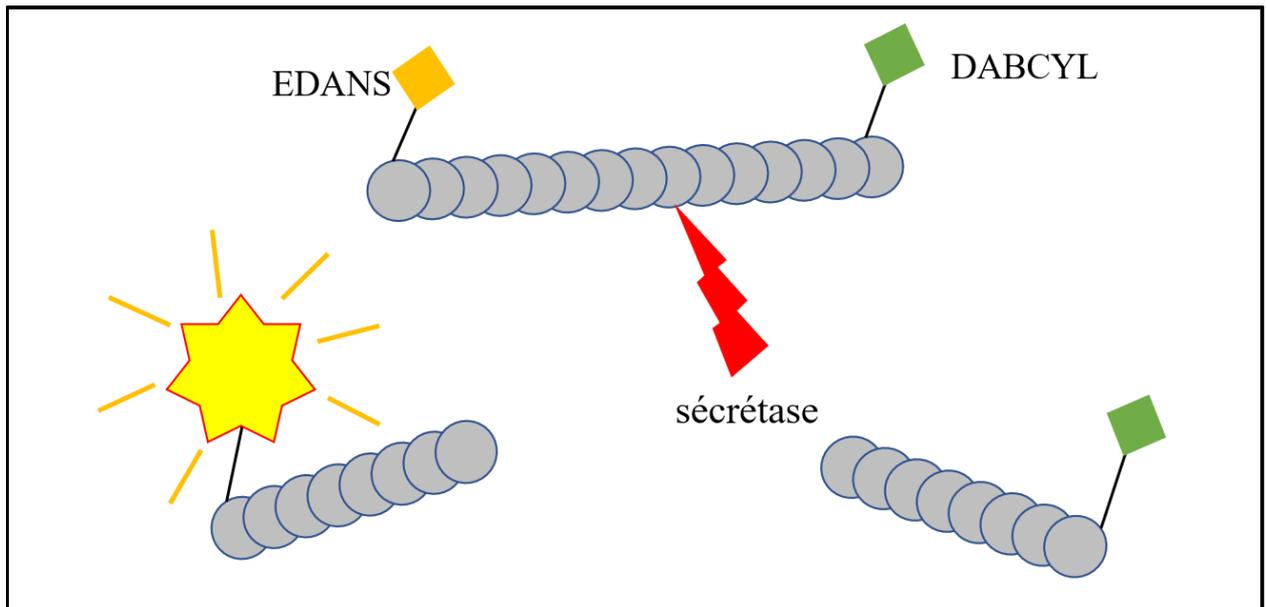


Figure 36 : Principe de détection de l'activité enzymatique des sécrétases

Résultats

1 Volet 1

1.1 Comparaison des effets bénéfiques du resvératrol et de la viniférine administrés entre 7 et 11 mois

La quantification par immunofluorescence des dépôts amyloïdes, marqués par l'anticorps W02, a mis en évidence une diminution de l'ordre de 79 % ($P < 0,005$) de l'intensité (taille et densité) des plaques amyloïdes dans le groupe de souris APP^{swe}PS1^{dE9} traitées par la viniférine par rapport aux souris ayant reçu le véhicule (**figure 37**), alors que le resvératrol n'a induit une diminution que de 32 % (NS) de cette intensité. Aucun effet sexe n'est observé concernant les dépôts amyloïdes. Il en est d'ailleurs de même pour tous les autres paramètres du volet 1 étudiés.

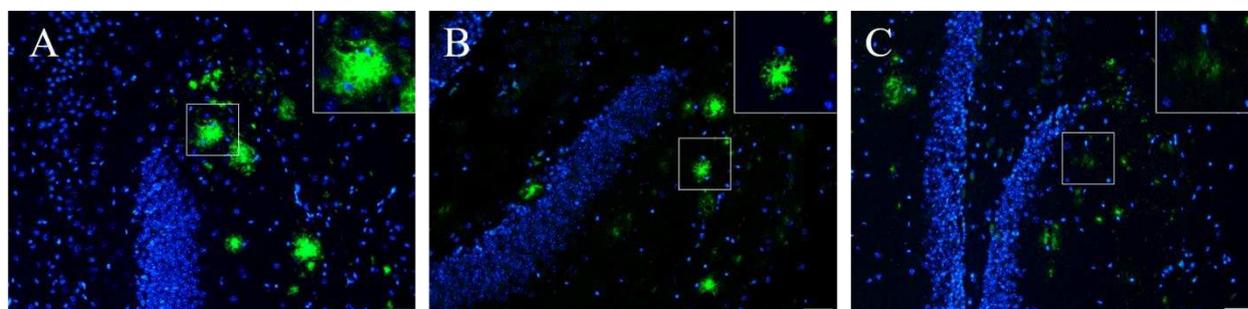


Figure 37 : Marquage par immunofluorescence des dépôts amyloïdes dans l'hippocampe des souris APP^{swe}PS1^{dE9}

Les plaques amyloïdes ont été marquées en vert grâce à l'anticorps W02 dirigé contre le peptide amyloïde et les noyaux en bleu par le DAPI

A : souris APP^{swe}PS1^{dE9} traitée par le PEG 200

B : souris APP^{swe}PS1^{dE9} traitée par le resvératrol

C : souris APP^{swe}PS1^{dE9} traitée par la viniférine

Sur chaque image un zoom X20 a été réalisé. Echelle : 50 μ m

La fixation du radiotracer [¹⁸F]Florbetaben visible par imagerie TEP-scan dans l'hippocampe des souris APP^{swe}PS1^{dE9} est significativement diminuée lorsqu'elles ont été traitées par la viniférine et le resvératrol en comparaison des souris APP^{swe}PS1^{dE9} ayant reçu le véhicule, avec une plus forte significativité de la viniférine ($P < 0,0001$ vs $P = 0,0016$) (**figure 38**). Ce résultat est en accord avec les observations et analyses d'IF qui montrent un effet de la viniférine plus important que celui du resvératrol.

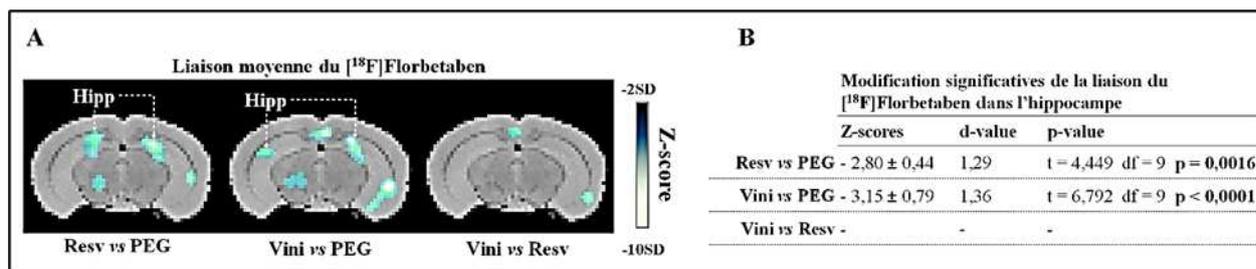


Figure 38 : Fixation du radiotracteur [¹⁸F]Florbetaben dans l'hippocampe des souris APPswePS1dE9

A : Images coronales des différences significatives de la fixation du [¹⁸F]Florbetaben entre les souris traitées par le PEG 200, le resvératrol et la viniférine

B : Tableau résumant les différences statistiques entre les 3 groupes de souris (test t non-apparié)

Le dosage par ELISA de l'A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ a montré une diminution significative de 32 % et 40 % (P < 0,05) de l'A β ₁₋₄₀ et l'A β ₁₋₄₂ insolubles respectivement, au niveau de l'hippocampe des souris APPswePS1dE9 traitées par la viniférine par rapport aux souris ayant reçu le véhicule alors que le traitement avec le resvératrol n'a induit aucune modification significative. Cette fraction insoluble est décrite dans la littérature comme étant celle des plaques amyloïdes contrairement à la fraction soluble qui correspondrait aux oligomères d'A β , actuellement considérés comme les plus toxiques dans la MA (Lacor et al., 2007 ; Lambert et al., 1998). Il n'y a pas d'augmentation de ces formes toxiques d'A β , qui auraient pu résulter de la diminution des plaques observée chez les souris ayant été traitées par les polyphénols. En effet, aucune différence significative n'est observée dans la fraction soluble au niveau de l'hippocampe entre les 3 groupes de souris APPswePS1dE9.

Notre hypothèse a donc été que la viniférine n'agissait peut-être pas uniquement sur l'agrégation et la désagrégation du peptide amyloïde mais pourrait agir également sur le métabolisme de l'APP. Comme il était impossible de doser l'activité des sécrétases dans les homogénats hippocampiques (car contenant des inhibiteurs des protéases, permettant une meilleure conservation des lysats pour les western blots), nous avons tenté d'évaluer par western blot l'expression d'un produit de l'activité de la β -sécrétase, le fragment C99 terminal. Nous avons ainsi montré que le traitement avec la viniférine conduisait à une diminution significative de 56 % (P < 0,05) de l'expression de ce fragment C99 tandis que le traitement avec le resvératrol n'avait aucun effet sur cette expression.

Ainsi, il apparaît que la viniférine réduit de manière plus efficace que le resvératrol les dépôts amyloïdes ainsi que le fragment C99. Ce dernier résultat suggère une action inhibitrice de l'activité de la β -sécrétase et donc de la voie métabolique amyloïdogène de l'APP mais nécessiterait néanmoins d'être confirmé par une étude d'activité enzymatique dans des conditions expérimentales ne nécessitant pas l'utilisation d'inhibiteurs de protéases dans le tampon de lyse.

Le temps de rétention mesuré à 11 mois par la technique du WM chez les souris sauvages et APPswePS1dE9 n'a pas permis de mettre en évidence une différence entre les 2 groupes de souris quel que soit le traitement (**figure 39**), ce qui semble démontrer que les troubles mnésiques de ces souris Alzheimer ne sont pas encore significatifs à l'âge de 11 mois. Nous pouvons néanmoins remarquer une grande variabilité interindividuelle dans chacun des groupes de souris. Dans ce graphique, de même que les suivants, les mâles sont représentés par des triangles bleus et les femelles par des ronds roses.

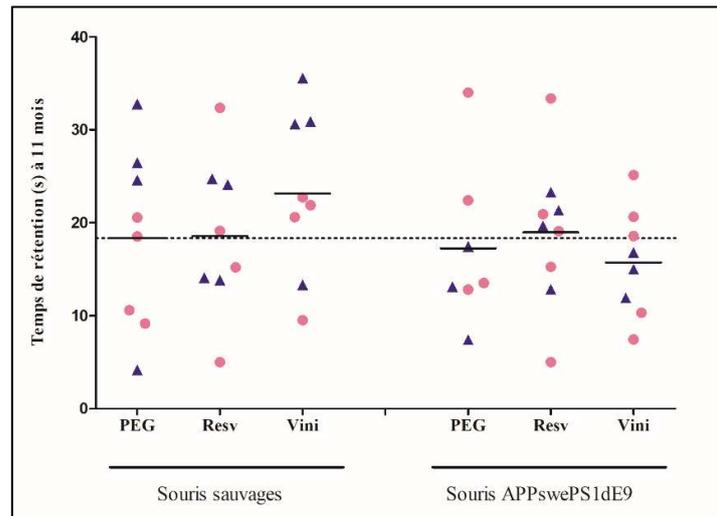


Figure 39 : Analyse du temps de rétention au jour 5

Pour comparer les valeurs des groupes 2 à 2, le test de Mann-Whitney a été utilisé.

Cependant, la variation individuelle du temps de rétention entre 7 et 11 mois, évaluée selon la formule ci-dessous nous a permis de faire une observation intéressante.

$$\text{Variation} = \frac{\text{temps passé dans le cadran cible (11 mois)} - \text{temps passé dans le cadran cible (7 mois)}}{\text{temps passé dans le cadran cible (7 mois)}}$$

Cette formule permet de montrer un déclin mnésique si le résultat est inférieur à 0. En revanche, une variation positive semble témoigner d'un meilleur apprentissage et d'une amélioration de la mémoire. Cette formule permet par ailleurs de s'affranchir de la variabilité interindividuelle car évalue l'évolution des capacités mnésiques de chaque souris.

Ainsi nous observons une variation du temps de rétention positive chez les souris APPswePS1dE9 traitées par la viniférine (+ 16,6 %) et le resvératrol (+ 22,8 %), alors que cette variation était négative chez les souris APPswePS1dE9 traitées par le véhicule (- 15,2 %), ce qui semble illustrer une prévention partielle du déclin mnésique par ces polyphénols. Toutefois cette variation positive est moindre que celle observée chez les souris sauvages, qui ont toutes progressé, quel que soit leur traitement. Il semblerait donc que ces deux polyphénols, administrés chaque semaine à la dose

de 20 mg/kg, préviennent partiellement le déclin de la mémoire spatiale mais ce résultat n'est malheureusement pas significatif (**figure 40**).

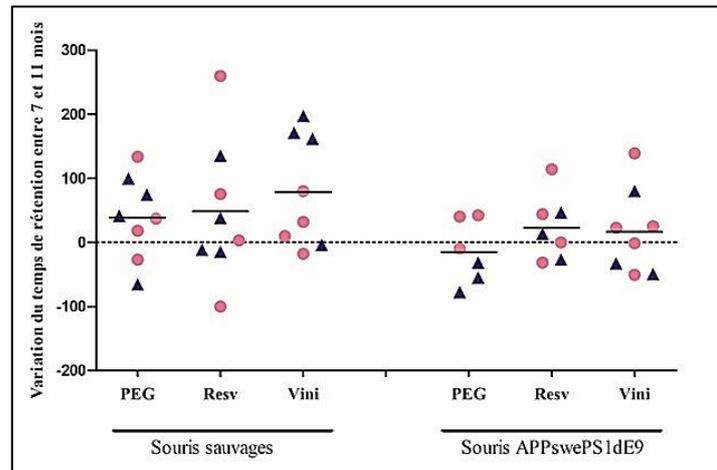


Figure 40 : Variation individuelle du temps de rétention entre 7 et 11 mois

Pour comparer les valeurs des groupes 2 à 2, le test de Mann-Whitney a été utilisé.

En ce qui concerne la neuroinflammation, la quantification par immunofluorescence et par western blot des marqueurs de l'inflammation n'a montré aucune différence entre les trois groupes de souris APPswePS1dE9.

En effet, la détection des astrocytes et de la microglie, par immunomarquage avec des anticorps dirigés contre les protéines GFAP (**figure 41**) et IBA1, ainsi que la quantification par western blot de l'expression de ces protéines par les mêmes anticorps (**figure 42**), n'ont montré aucune différence de marquage entre les trois groupes de souris APPswePS1dE9.

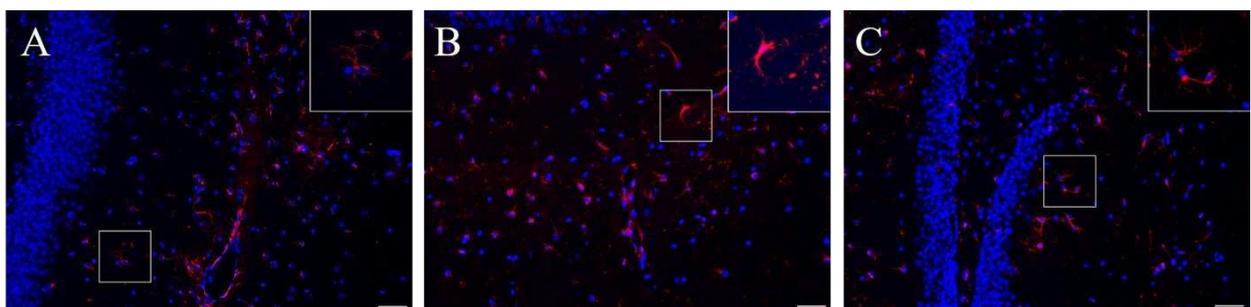


Figure 41 : Marquage par immunofluorescence des astrocytes dans l'hippocampe des souris APPswePS1dE9

Les astrocytes ont été marqués en rouge avec un anticorps dirigé contre GFAP et les noyaux en bleu par le DAPI

A : souris APPswePS1dE9 traitée par le PEG 200

B : souris APPswePS1dE9 traitée par le resvératrol

C : souris APPswePS1dE9 traitée par la viniférine

Sur chaque image un zoom X20 a été réalisé. Echelle : 50 μ m

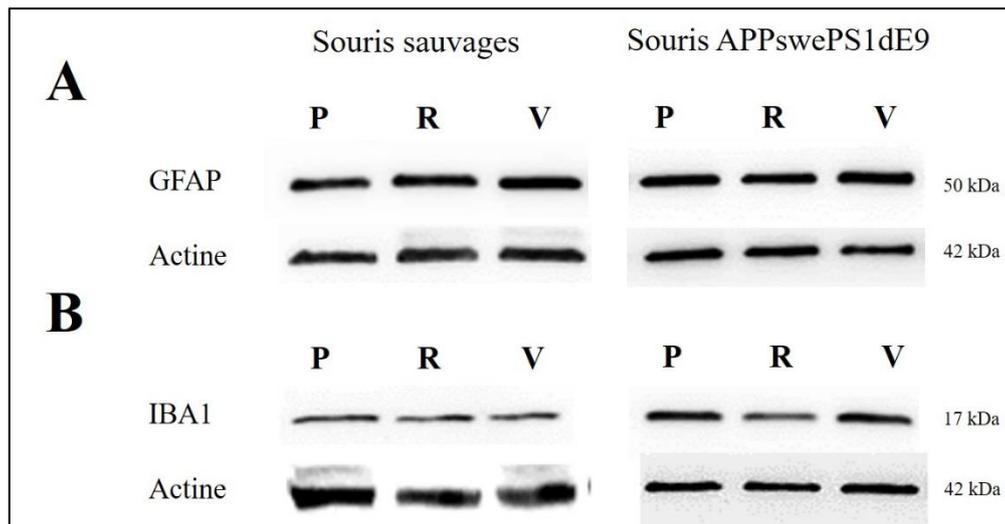


Figure 42 : Expression de GFAP et d'IBA1 dans l'hippocampe des souris sauvages et APPswePS1dE9

A : Révélation de la GFAP chez les souris sauvages et APPswePS1dE9 traitées par le PEG 200, le resvératrol ou la viniférine

B : Révélation d'IBA1 chez les souris sauvages et APPswePS1dE9 traitées par le PEG 200, le resvératrol ou la viniférine

(P : PEG 200 ; R : Resvératrol ; V : Viniférine)

Le [¹⁸F]DPA-714 ciblant la TSPO, quant à lui, s'est fixé de la même manière dans l'hippocampe des souris APPswePS1dE9 traités par les polyphénols ou le véhicule. Cependant le groupe traité par la viniférine présente une diminution significative de la fixation du radiotracer en comparaison du groupe resvératrol. Ce résultat différent de celui obtenu par IF peut s'expliquer par le fait que le marqueur de la microglie ne soit pas le même pour les 2 techniques.

Lorsque ces marqueurs de l'inflammation ont été étudiés par IF dans les groupes contrôles de souris sauvages, nous avons été très surpris de constater un marquage anormalement élevé des astrocytes et de façon moindre, de la microglie. La quantification du marquage GFAP par IF (**figure 43**) et de l'expression de cette protéine par western blot (**figure 45**) a confirmé qu'elle était anormalement importante dans l'hippocampe des souris sauvages ayant reçu le véhicule utilisé pour solubiliser les polyphénols, le PEG 200, nous faisant suspecter un effet pro-inflammatoire de cet excipient.

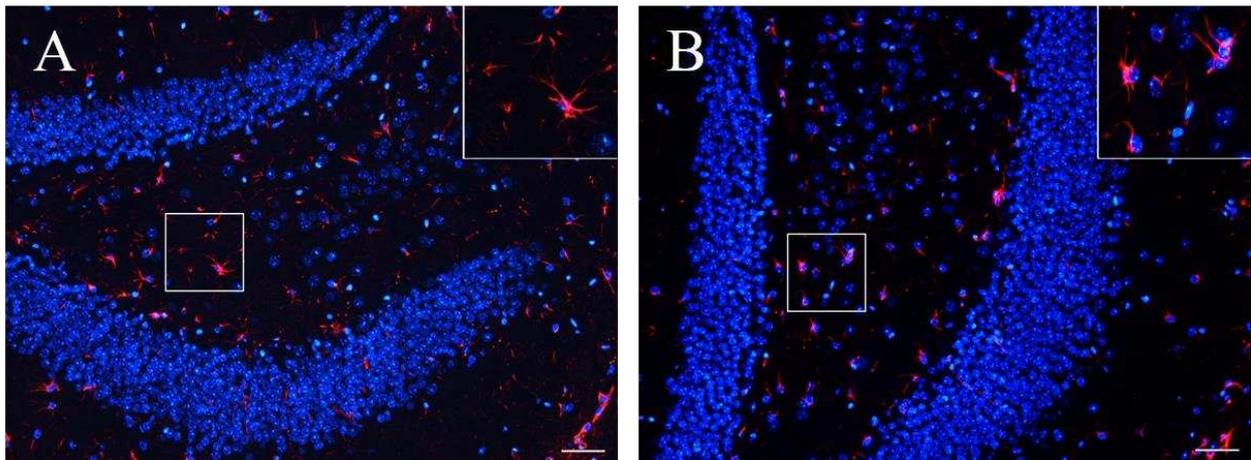


Figure 43 : Marquage par immunofluorescence des astrocytes dans l'hippocampe des souris sauvages et APPswPS1dE9

Les astrocytes ont été marqués en rouge avec un anticorps dirigé contre GFAP et les noyaux en bleu par le DAPI

A : souris sauvage traitée par le PEG 200

B : souris APPswPS1dE9 traitée par le PEG 200

Sur chaque image un zoom X20 a été réalisé. Echelle : 50 μ m

La conséquence de cette observation est que l'absence d'effet bénéfique des polyphénols sur la neuroinflammation hippocampique des souris APPswPS1dE9 est peut-être un résultat biaisé par l'effet pro-inflammatoire inattendu du PEG 200. Ces résultats sont présentés dans l'article 2.

La viniférine a donc une efficacité supérieure à celle du resvératrol sur la diminution des dépôts amyloïdes et la réduction du fragment C99 généré par l'activité de la β -sécrétase sur l'APP. Les deux polyphénols préviennent partiellement et de façon équivalente le déclin mnésique. En revanche, il est difficile de conclure quant à leurs effets éventuels sur la neuroinflammation suite à l'observation d'un effet pro-inflammatoire du véhicule, le PEG 200.

L'ensemble de ces résultats est résumé dans **la table 6**.

Volet 1 (traitement de 7 à 11 mois)		
Paramètres étudiés	Resvératrol	Viniférine
Dépôts amyloïdes	Intensité (taille et densité) des plaques (IF)	
	- 32 %	- 79 % **
	Diminution des plaque (TEP-scan)	
	↙ **	↙ ***
Niveaux d'Aβ ₁₋₄₀	Fraction insoluble	
	- 1 %	- 32,2 % *
	Fraction soluble	
	- 12,4 %	- 37,3 %
Niveaux d'Aβ ₁₋₄₂	Fraction insoluble	
	- 16,7 %	- 40,2 % *
	Fraction soluble	
	- 35 %	- 21,5 %
Fragment C99	Expression de C99	
	+ 4 %	- 56 % *
Neuroinflammation	Effet non visible (Effet pro-inflammatoire du PEG 200)	
Déclin mnésique	Prévention partielle (NS) (WM)	

Table 6 : Récapitulatif de la comparaison des effets du resvératrol et de la viniférine administrés entre 7 et 11 mois

PEG vs Polyphénols : * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$

Toutes ces données expérimentales ont permis d'écrire un premier article de résultats expérimentaux s'intitulant : « *Trans ε-viniferin decreases amyloid deposits with better efficiency than resveratrol in APPswePS1dE9 mice* ».

Article 1

Freyssin A, Page G, Galineau L, Serrière S, Tauber C, Perrin F, Guillard J, Fauconneau B, Chalon S*,
Rioux Bilan A* (*Co-last authors).

Trans ϵ -viniferin decreases amyloid deposits with better efficiency than resveratrol in APP^{swe}PS1^{dE9} mice

Soumis dans « Current Alzheimer research », numéro de soumission : CAR-2020-0110.



Trans ϵ -viniferin decreases amyloid deposits with better efficiency than resveratrol in APPswePS1dE9 mice

Journal:	<i>Current Alzheimer Research</i>
Manuscript ID	CAR-2020-0110
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	08-May-2020
Complete List of Authors:	FREYSSIN, Aline; University of Poitiers, PAGE, Guylène; University of Poitiers GALINEAU, Laurent; University of Tours SERRIERE, Sylvie; University of Tours TAUBER, Clovis; University of Tours PERRIN, Flavie; University of Poitiers GUILLARD, Jérôme; University of Poitiers FAUCONNEAU, Bernard; University of Poitiers CHALON, Sylvie; University of Tours RIOUX BILAN, Agnès; University of Poitiers
Keywords:	Alzheimer's disease, Viniferin, Resveratrol, PET imaging, Amyloid deposits, Memory decline

SCHOLARONE™
Manuscripts

***Trans* ϵ -viniferin decreases amyloid deposits with better efficiency than resveratrol in APP^{swe}PS1dE9 mice**

Running title: Viniferin decreases amyloid deposits in AD mice

FREYSSIN Aline^{1#}, PAGE Guylène¹, GALINEAU Laurent², SERRIERE Sophie², TAUBER Clovis², PERRIN Flavie³, GUILLARD Jérôme³, FAUCONNEAU Bernard¹, CHALON Sylvie^{2*}, RIOUX BILAN Agnès^{1*}

[#]Corresponding author (aline.freyssin@univ-poitiers.fr), +33 5 49 36 62 63

^{*}Co-last authors

¹Université de Poitiers, EA3808 Neurovascular Unit and Cognitive Disorders, Pôle Biologie Santé, POITIERS, France, ²UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, TOURS, France,

³University of Poitiers, UMR CNRS 7285 Institute of chemistry of Poitiers, Team 5 Organic synthesis, POITIERS, France.

ABSTRACT

BACKGROUND: In a previous study, we showed that viniferin, a natural polyphenol, had a preventive effect in Alzheimer's disease, by decreasing the size and the density of amyloid deposits and lowering neuroinflammation in APPswePS1dE9 transgenic mice. However, these *in vivo* beneficial effects were not compared to those of the reference polyphenol, resveratrol. Moreover, the role of viniferin on cognitive decline was not studied.

OBJECTIVE: The aim of this present study was to compare the effects of viniferin to resveratrol on amyloid deposits, neuroinflammation and cognitive decline.

METHOD: The study included APPswePS1dE9 transgenic mice which already displayed amyloid plaques and neuroinflammation at the beginning of the treatment. Wild type and APPswePS1dE9 transgenic mice were treated from 7 to 11 months of age by a weekly intraperitoneal injection of either 20 mg/kg viniferin or resveratrol or their vehicle, the polyethylene glycol 200. Before and at the end of the treatment, cognitive status of mice was evaluated by the Morris water mazer test. Then, amyloid load, deposits and neuroinflammation were quantified by western-blot, ELISA, immunofluorescence and *in vivo* PET-scan imaging.

RESULTS: Viniferin decreased hippocampal amyloid load and deposits and C terminal fragment of APP protein with a better efficiency than resveratrol, as assessed by the different approaches we used. Moreover, both treatments partially prevent the cognitive decline. However, PET-scan imaging and other techniques showed no change in neuroinflammation.

CONCLUSION: Viniferin is more efficient than resveratrol to decrease amyloid load and deposits. Furthermore, both polyphenols partially prevent the memory decline.

Keywords (6): Alzheimer's disease; Viniferin; Resveratrol; PET imaging; Amyloid deposits; Memory decline.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder and the first cause of dementia in the World. Indeed, worldwide, there are over 9.9 million new cases of dementia each year, implying one new case every 3 seconds [1]. Thus, in the World, nearly 50 million people have Alzheimer's or related dementia [2]. This number will almost double every 20 years, reaching 75 million in 2030 and more than 130 million in 2050 [1]. Unfortunately, there are not effective treatments to cure AD. The cause of this disease is unknown, but many pathogenic mechanisms induce several cellular and molecular damages. One may cite the extracellular senile plaques, composed of aggregated amyloid beta ($A\beta$) peptide, the intracellular neurofibrillary tangles constituted by hyperphosphorylated tau protein, the exacerbated neuroinflammation, the synaptic loss in particular cholinergic hippocampal neurons and the oxidative stress [3–5]. Pharmacological drugs approved by authorities and currently used are acetylcholinesterase inhibitors [6] and uncompetitive antagonists of NMDA receptors [7], but these treatments are only symptomatic and do not prevent or cure pathological mechanisms involved in AD and neuronal death [8, 9].

Moreover, anti-amyloid- β and tau immunotherapy in clinical trials for AD have failed due a too late administration in the disease progression [10, 11]. Nowadays, clinical trials evaluating the effects of drugs targeting only one pathological aspect of AD, such as neuroinflammation [12] or oxidative stress [13–15] failed to demonstrate the efficiency of these treatments. In this context pharmacological treatments targeting simultaneously several characteristic lesions of AD could be more efficient. Consequently, natural polyphenols, which have been described to possess various biological properties, could be interesting candidates [16]. Thus, polyphenols have been described to have anti-inflammatory action [17–19], inhibit $A\beta$ aggregation and induce its disaggregation [20–22], inhibit phosphorylation and aggregation of tau and have protective effects against

A β -induced neuronal death [22–24]. One of them, *trans*-resveratrol¹, has been widely described in the literature for its beneficial properties on health, notably in the context of neurodegenerative diseases [25–27]. However, only one clinical trial about beneficial effects of this stilbene was reported in two papers. The first article described that resveratrol, administered to mild to moderate AD patients was safe and well tolerated but had ambivalent effects [28]. Indeed, the resveratrol treatment compared to *placebo* induced a beneficial inhibition of A β decrease in cerebrospinal fluid (CSF) but also, an increase of brain volume loss. Moreover, this treatment was described to modulate neuro-inflammation, and induce adaptive immunity [29]. Despite better performances in cognitive tasks were observed in resveratrol-treated AD mice [30], clinical trials failed to show any efficacy on cognitive functions [31, 32].

This molecule is rapidly metabolized in glucuronidated and sulfated forms which are excreted in the urine. Consequently, high doses are required but also induce adverse effects [28]. Another natural polyphenol, *trans* ϵ -viniferin², recently caught our attention. It is a dehydrodimer of *trans*-resveratrol, synthesized by *Vitis vinifera* in response to different stresses and thus could be constitutively found in the vine stalks and all woody parts of the vine. Viniferin could have higher beneficial properties than the reference polyphenol resveratrol, due to its chemical structure and reduced catabolism [33]. However, only few findings concerning its role in AD were published [34–39]. In a first *in vitro* study, we confirmed that viniferin inhibited amyloid aggregation but we also demonstrated that it induced the disaggregation of amyloid fibrils with higher efficiency than resveratrol [22]. Moreover, we showed that this stilbene rescued gliosis induced by aggregated A β in a murine primary culture of neurons, astrocytes and microglia, with better efficacy than resveratrol [22]. In a second *in vivo* study, using APP^{swe}PS1^{dE9} transgenic mice, we evaluated the preventive effect of viniferin [18]. Thus, AD mice received a weekly intraperitoneal (i.p.)

¹4-[(*E*)-2-(3,5-Dimethoxyphenyl)ethenyl]phenol

² 5-[(2*R*,3*R*)-6-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-[(*E*)-2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl]-2,3-dihydro-1-benzofuran-3-yl]benzene-1,3-diol

injection of viniferin 10 mg/kg from 3 until 6 months. We reported that viniferin could go through the blood brain barrier and had beneficial preventing effects, by reducing size and density of amyloid deposits and decreasing reactivity of astrocytes and microglia [18]. However, as in these mice the characteristic histopathological lesions of the disease are not yet present at 3 months of age and appear from 4-6 months, this study only demonstrated preventive effects of viniferin. Effects of treatment after development of characteristic histopathological lesions, *i.e.* later than 6 months of age, remain unknown. Moreover, these beneficial effects were not compared to those of resveratrol. Finally, it would be necessary to determine if these polyphenols could rescue the cognitive decline. For all these reasons, we decided to administrate resveratrol or viniferin from 7 to 11 months in APPswePS1-dE9 and WT mice. The aim of this study was so to compare effects of both polyphenols on (1) amyloid deposits, (2) neuroinflammation, and (3) cognitive decline. We previously demonstrated that a concomitant increase in the β -amyloid load and index of microglial activation 18 kDa translocator protein (TSPO) was detected in this Tg model by PET imaging [40]. Therefore, this same *in vivo* investigation was performed in the present study in 3 experimental groups.

2. Materials and Method

2.1. Chemical products

All chemical products used in this study are indicated in the supplementary data **table 1**.

2.2. Animals and experimental design

In the laboratory, we have APPswePS1dE9 transgenic mice (from Mutant Mouse Resources and Research Centers, Stock No: 34829-JAX) displaying Alzheimer phenotype (Authorization from “Haut Comité de Biotechnologie français” (HCB) to Pr Guylène Page, number 2040 for reproduction, treatment, behavioral tests and *ex-vivo* experiments). Wild type (WT) with B6C3F1 background and APPswePS1dE9 mice were obtained by crossing a male APPswePS1dE9 mouse

with a WT female mouse (from Charles River, strain Code 031). The use of animals was approved by the Ethical and Animal Care Committee (N°84 COMETHEA, Ethical Committee for Animal Experimentation) Poitou-Charentes, France) and by the French ministry (agreement number: 2015072717461531 to Pr Guylène Page as designer of experimental projects on animals for scientific purposes) and agreement APAFIS#13481-2018.013115261004.V3 for imaging experiments. At weaning, all mice were genotyped by polymerase chain reaction (PCR) analysis of tail biopsies according to the manufacturer's recommended protocols. All animal care and experimental procedures conformed with the French Decret number 2013–118, 1 February 2013 NOR: AGRG1231951D in accordance to European Community guidelines (directive 2010/63/UE).

All efforts were made to minimize animal suffering, as well as the number of animals used. The animals were housed in a conventional state under adequate temperature ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$) and relative humidity ($55 \pm 5\%$) control with a 12/12 h reversed light/dark with access to food and water *ad libitum*. During all the study, the general state health of the mice was evaluated weekly by monitoring their body weight, food and water intake. For this study 27 AD mice (13 males and 14 females) and 24 WT mice (12 males and 12 females) were used. Mice were treated from 7 to 11 months of age by a weekly intraperitoneal IP injection of either *trans* ϵ -viniferin (Vini) at 20 mg/kg (4 AD males, 5 AD females, 4 WT males and 4 WT females), *trans*-resveratrol (Resv) at 20 mg/kg (4 AD males, 5 AD females, 4 WT males and 4 WT females) or their vehicle, the polyethylene glycol 200 (PEG) at 1.67 mL/kg (5 AD males, 4 AD females, 4 WT males and 4 WT females). This dose of resveratrol and viniferin was chosen trusting that the beneficial effects would be overcome after the results of the first study at 10 mg/kg.

All treatments were diluted in 0.9% NaCl. At the beginning of the study and at the end of each treatment, behavioral test was performed. PET-scan imaging has only been done at the end of each treatment. Finally, once a week after PET-scan imaging, mice were euthanized.

Thus, mice were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) after deep anesthesia with a mix of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Brains were rapidly removed, and the right hemisphere was immediately placed in 4% PFA at 4°C for immunofluorescence.

In the left hemisphere, hippocampus was dissected and homogenized for biochemical experiments. All samples were stored at -80°C until further experiments.

In all groups (PEG, Resv, Vini), some mice prematurely died. Moreover, the volume of hippocampal lysates was low and did not allow to detect all signals by western blot for some mice. Thus, the number of animals was variable for different experimental procedures as indicated in the legend of figure and table 4.

2.3. Behavioral test by Morris water maze

For behavioral test by Morris water maze (MWM), mice were individually placed in a round pool (1 m diameter, 0.5 m height) and filled with crushed white chalk mixed to water at room temperature (RT). An escape platform (5 cm diameter) was placed at 15 cm from the edge of the tank of the north east quadrant of the pool. This platform was submerged under the water surface and was not visible by the mice. During the entire test, this pool was placed in a quiet room with visual cues. A camera recorded the mice's pathway and behavior. The test consisted of four consecutive daily training period followed by the retention test the 5th day. For the training period, before the first trial, mice were placed on the submerged platform for 5 s. Mice were tested 4 trials *per day*, with different starting locations, following a define sequence. Each trial has a maximal duration of 60s. If the mouse did not find the escape platform in 60s, it was physically placed on the platform to learn for 20s. For the retention test, on the 5th day, the platform was removed, and mice were allowed to swim for 60s. The trend of the mice to search for the platform was evaluated by quantification of the time spent in the target quadrant where the escape platform was previously located. The time spent for each mouse in the target quadrant and the distance traveled by mice

were recorded and processed using video tracking device and computer-equipped analytics management system (Kinovea.org software, 0.8.15). The MWM protocol was applied twice, first time before the first injection, at 7 months of age, and second time after the last injection, at 11 months. To evaluate effects of molecules on cognitive status of mice, we evaluated the evolution of their performance for the retention test between 7 (before the initiation of the treatment) and 11 months (at the end of the treatment). Thus, for each mouse, this evolution was quantified by this formula:
$$\frac{\text{time spent in the target quadrant(11 months)}-\text{time spent in the target quadrant (7 months)}}{\text{time spent in the target quadrant (7 months)}}$$
.

Motor capacities of mice were evaluated by quantifying the average speed swimming at 7 and 11 months.

2.4. PET-scan imaging

The β -amyloid load and TSPO imaging were assessed using [^{18}F]Florbetaben and [^{18}F]DPA-714, respectively, which were prepared as described previously [41] and obtained with a mean molar activity of 50-150 GBq/ μmol . Each animal was explored with both tracers with a minimum delay of 3 days between each imaging experiment, according to [40]. The mice received an i.v. injection of either [^{18}F]Florbetaben or [^{18}F]DPA-714 (15-20 MBq) in the tail vein under gas anesthesia (1.5-2% isoflurane in 1.5-2 L/min of O_2). A 5 min CT-scan was first acquired for 5 min for attenuation correction, and animals were then scanned over 61 min using a Super Argus PET/CT system (Sedecal, Spain). PET images were rebinned into 33 frames, and the last 30 min acquisition were extracted for reconstruction, and then analysis using PMOD (3.403, PMOD Technologies, Zurich, Switzerland, www.pmod.com). Then, a voxel-based analysis was used to assess the differences in radiotracer binding between the averaged brains of Vini vs. Res vs. PEG treated mice. This was performed using unpaired Student's two-tailed t-test with p-values corrected for multiple comparisons using the Benjamini-Hochberg control of false discovery rate [42]. However, all the individual voxel comparisons missed significance, as described in other

PET studies with low degrees of freedom [43]. Therefore, Z-score maps with a threshold of $p=0.05$ for uncorrected p-values were generated. The regions of interest were derived from Mirrione's templates using PMOD v3.2 software and applied to Z-score maps to obtain the Z-score values in regions of interests. Inter-group comparison was performed using a two-tail unpaired student t-test. Effect size was evaluated for each significant difference observed and expressed as d-values corresponding to a large effect sizes for d values superior to 0.80 [44]. The signals extracted using the ROIs on the z-score maps were considered for further analysis when representing at least 50 contiguous voxels for a statistical threshold set at $p < 0.05$.

2.5. Immunofluorescence experiments

After 24 h in 4% paraformaldehyde at 4°C, right brain hemispheres were rinsed in PBS (phosphate buffer saline), dehydrated, and embedded in paraffin for sagittal sectioning (4 μm thickness). Sagittal sections were cut in a microtome (Microm Microtech, Brignais, France) and mounted on Super-Frost Plus1 slides (CML, Nemours, France) with water and conserved at 4°C until their utilization. Immunolabellings were performed as previously described [45, 46], using specific antibodies at the dilutions indicated in the **table 2**. Multiple labelled samples (2 slices *per* mice) were examined with Olympus BX51 epifluorescent optical microscope. Images were blind analyzed with ImageJ, as previously described [18]. Multiple labelled samples were also examined with a spectral confocal FV-1000 station installed on an inverted microscope IX-81 (Olympus, Tokyo, Japan) with Olympus x60 oil, 1.2 NA, objective lens with optical section separation (z-interval) of 0.3 μm . Fluorescence signal collection, image construction, and scaling were performed using the control software (Fluoview FV-1000, 4.2.1.20 Olympus). Multiple fluorescence signals were acquired sequentially to avoid crosstalk between image channels. Fluorophores were excited with 405 nm line of a diode (for DAPI), and 543 nm line of an HeNe laser (for TRITC). Emitted fluorescence was detected through spectral detection channels and images were merged as an RGB image.

Table 2: Primary and secondary antibodies used in the study.

<i>Primary antibodies</i>			
Antibodies	Dilution for WB	Dilution for IF	Sources
Mouse anti amyloid peptide (clone W02)	/	1:100	Millipore
Rabbit anti GFAP	1:1000	1:100	Cell signaling
Goat anti IBA-1	1:500	1:100	Abcam
Mouse anti β -actin	1:10000	/	Sigma Aldrich
<i>Secondary antibodies</i>			
Antibodies	Dilution for WB	Dilution for IF	Sources
Donkey anti-mouse-Alexa 488	/	1:50	Jackson immunoresearch
Donkey anti-rabbit-RRX	/	1:50	Jackson immunoresearch
Donkey anti-goat RRX	/	1:50	Jackson immunoresearch
Donkey anti goat IgG-HRP	1:1000	/	Santa cruz
Goat anti rabbit IgG-HRP	1:1000	/	Cell Signaling Technology
Horse anti mouse IgG-HRP	1:1000	/	Cell Signaling Technology

2.6. Biochemical experiments

Preparation of protein lysates

After euthanasia, hippocampus of the left hemisphere was dissected and homogenized for biochemical experiments as previously described [47] in 10 volumes of lysis buffer (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) and supplemented with 50 mM NaF, 1 mM PMSF, protease and phosphatase inhibitor cocktails (50 μ L/g of tissue and 10 μ L/mL of lysis buffer, respectively). Before use, supernatants were stored at -80°C. For ELISA experiments, needing the use of insoluble fraction, pellet was suspended with 30 μ L of lysis buffer before treatment of guanidine as explained below.

Western blots

For each sample, 20 μ g proteins were denatured in Laemmli Sample Buffer containing DTT by boiling during 5 min. Electrophoreses in 4-20% Tris-Glycine gels were performed according manufacturer recommendations (at 150 V during 40 min in Tris-Glycine SDS Running Buffer). Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes using the Trans-Blot Turbo system set

to program 25V for 7 min. Membranes were washed for 10 min in Tris-buffered saline/Tween (TBST: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.05% Tween 20) and non-specific antigenic sites were blocked 2h in TBST containing 5% semi-skimmed milk and 0.21% sodium fluoride. Membranes were incubated with primary antibodies at the adequate dilution (**table 2**) overnight at 4°C. Then, they were washed twice with TBST and incubated with the HRP-conjugated secondary antibodies (**table 2**) during 1 h at RT. Membranes were washed again and exposed to the chemiluminescence Luminata Forte Substrate. After 2 washes in TBST, membranes were put in contact with mouse antibodies against β -actin overnight at 4°C, washed with TBST and incubated with HRP-conjugated secondary antibodies for 1h before to be exposed to the chemiluminescence Luminata Classico Substrate. All luminescent signals were captured by the Gbox system (GeneSnap software, Syngene, Ozyme distributor). Automatic image analysis software was supplied with Gene Tools (Syngene, Ozyme distributor). In each case, interest protein / β -actin *ratios* were calculated. Results were then normalized as a percentage of expression in PEG treatment for both groups (WT and AD).

A β 40-42 ELISA

Levels of A β ₄₂ and A β ₄₀ were quantified using ELISA kit (Gibco-Invitrogen). Concerning the insoluble fraction, pellets obtained after preparation of hippocampal homogenates from left hemisphere were suspended with 30 μ L of lysis buffer. Then, a homogenization with 8 volumes of guanidine-Tris buffer (5M guanidine HCl/50 mM Tris-HCl, pH 8.0) was performed in order to extract insoluble A β . Homogenates were incubated at RT for 4 h before they were assayed. Samples were diluted in cold BSAT-DPBS reaction buffer (0.2 g/L KCl, 0.2 g/L KH₂PO₄, 8.0 g/L NaCl, 1.15 g/L Na₂HPO₄, 5% BSA, 0.03% Tween-20, pH 7.4) supplemented with Protease Inhibitor Cocktail. Samples were centrifuged at 16,000g for 20 min at 4°C. The supernatant was diluted in standard diluents buffer available in the kit. The final concentration of AEBSF (included in protease inhibitor cocktail) was 1 mM in order to prevent proteolysis of A β peptides. The human

A β ₄₂ and A β ₄₀ standards were diluted in the same standard diluent buffer of samples. Plates were incubated with detection antibody overnight at 4°C. Concerning the soluble fraction, the same steps of homogenization with guanidine and dilutions were performed. After washing, plates were incubated with HRP anti-rabbit antibodies for 30 min at RT, then they were washed, and stabilized chromogen was added in each well for 30 min in a dark chamber at RT. After stopping the reaction, the absorbance of plates was read at 450 nm using the Multiskan spectrum spectrophotometer. The standard curves were established using a range of concentrations (15.63–1,000 pg/mL) of a synthetic A β ₄₂ peptide, and a range of concentrations (7.81–500 pg/mL) of a synthetic A β ₄₀ peptide. Data are expressed as pg of total A β ₄₂₋₄₀/mg of proteins.

2.7. Statistical analysis

Results were expressed as means \pm standard error (SEM). Statistical program Graph-Pad (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used to compare quantitative variables. For all comparisons, the level of significance was $p < 0.05$. To compare quantitative variables between two groups of mice (PEG *vs* Resv, PEG *vs* Vini and Resv *vs* Vini), Mann-Whitney test was used.

3. Results

3.1 Reduction of the hippocampal amyloid burden, deposits and amyloidogenic metabolism of APP by viniferin

In this study, amyloid deposits in hippocampus of each mouse were visualized by immunofluorescence, using monoclonal mouse anti-amyloid W02 clone, which recognizes amino acid residues 4–10 of human A β . The hippocampal amyloid plaques in viniferin-treated AD mice appeared to be less compact and intense than those of vehicle-treated mice (Figs 1A-B). The global amyloid burden quantified by immunofluorescence in hippocampus of AD mice showed a significant decrease by 43% with viniferin compared to vehicle-treated mice ($p < 0.05$, Fig 2A).

When the image analysis was focused only on aggregated amyloid plaques, viniferin significantly reduced (-79%, $p < 0.005$) the density of hippocampal amyloid deposits in these AD mice (Fig 2B). Resveratrol did not induce a significant decrease of both parameters in hippocampus compared to vehicle-treated AD mice (Figs 1A-B and 2A-B).

These results were completed by quantification of hippocampal insoluble and soluble A β 40 and A β 42 burdens in AD mice treated with polyphenols or PEG, using ELISA. Compared to the vehicle-treated AD mice, levels of both A β 42 and A β 40 insoluble fractions were significantly reduced by 40.2% and 32%, respectively ($p < 0.05$ Fig 2C, E) in the hippocampus of viniferin-treated mice while no significant differences were observed between resveratrol treated mice and viniferin-treated mice. About the soluble A β , no significant difference was observed between all groups (Fig 2D, F).

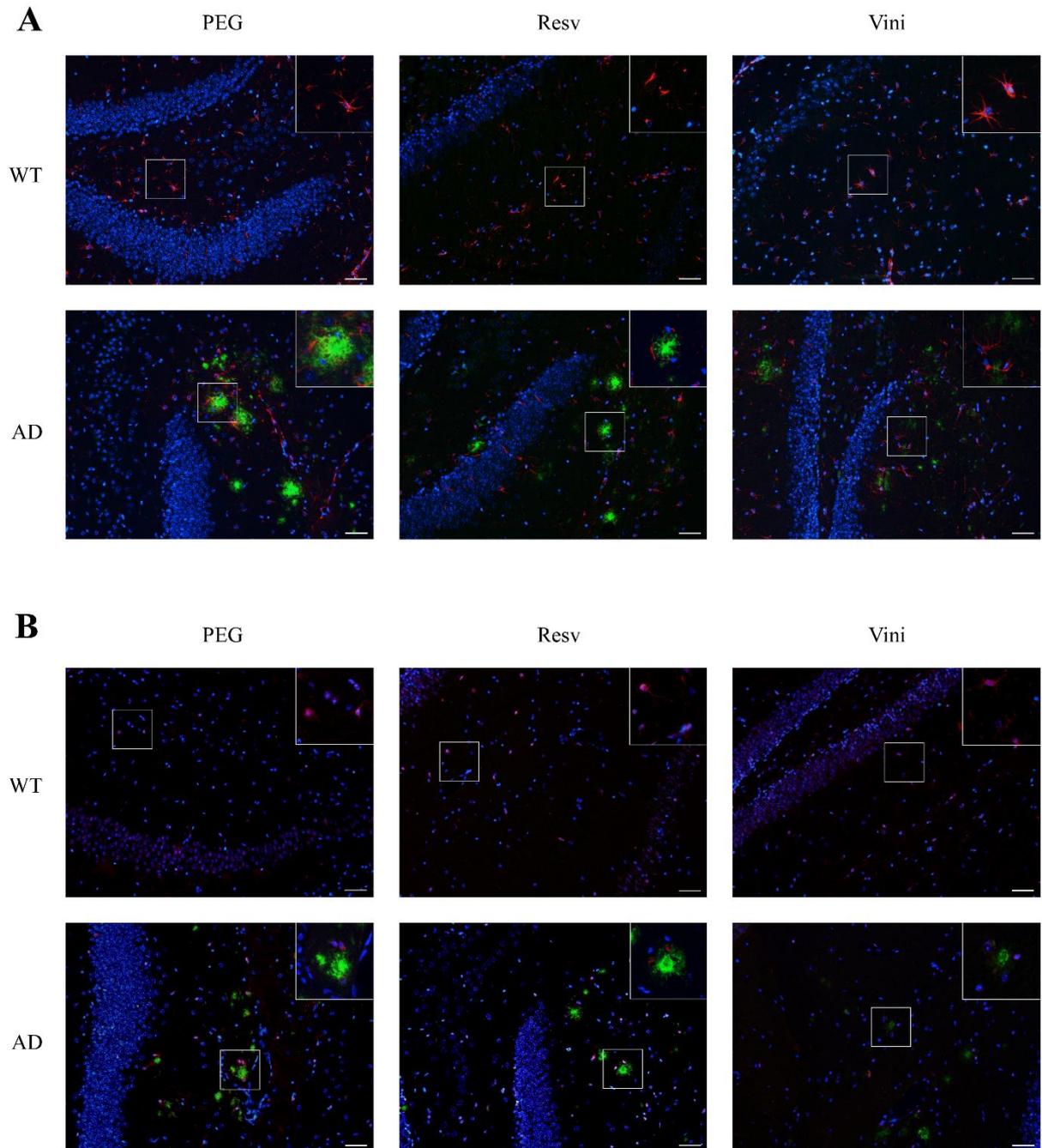


Fig 1. Effects of resveratrol and viniferin on hippocampal amyloid deposits and reactivity of astrocytes and microglia.

The WT mice and the double transgenic APP^{sw}PS1^{dE9} mice were treated by resveratrol, *trans* ϵ -viniferin or their vehicle (PEG 200) intraperitoneally from 7 to 11 months of age. The senile plaques were stained with antibody against amyloid peptide (green). The astrocytes and microglia were stained with antibodies against GFAP (panel **A**) and against IBA-1 (panel **B**), respectively (red) and the nuclei with DAPI (blue). On each image, a magnification (X20) delineated by a white frame was added. Scale bars: 50 μ m.

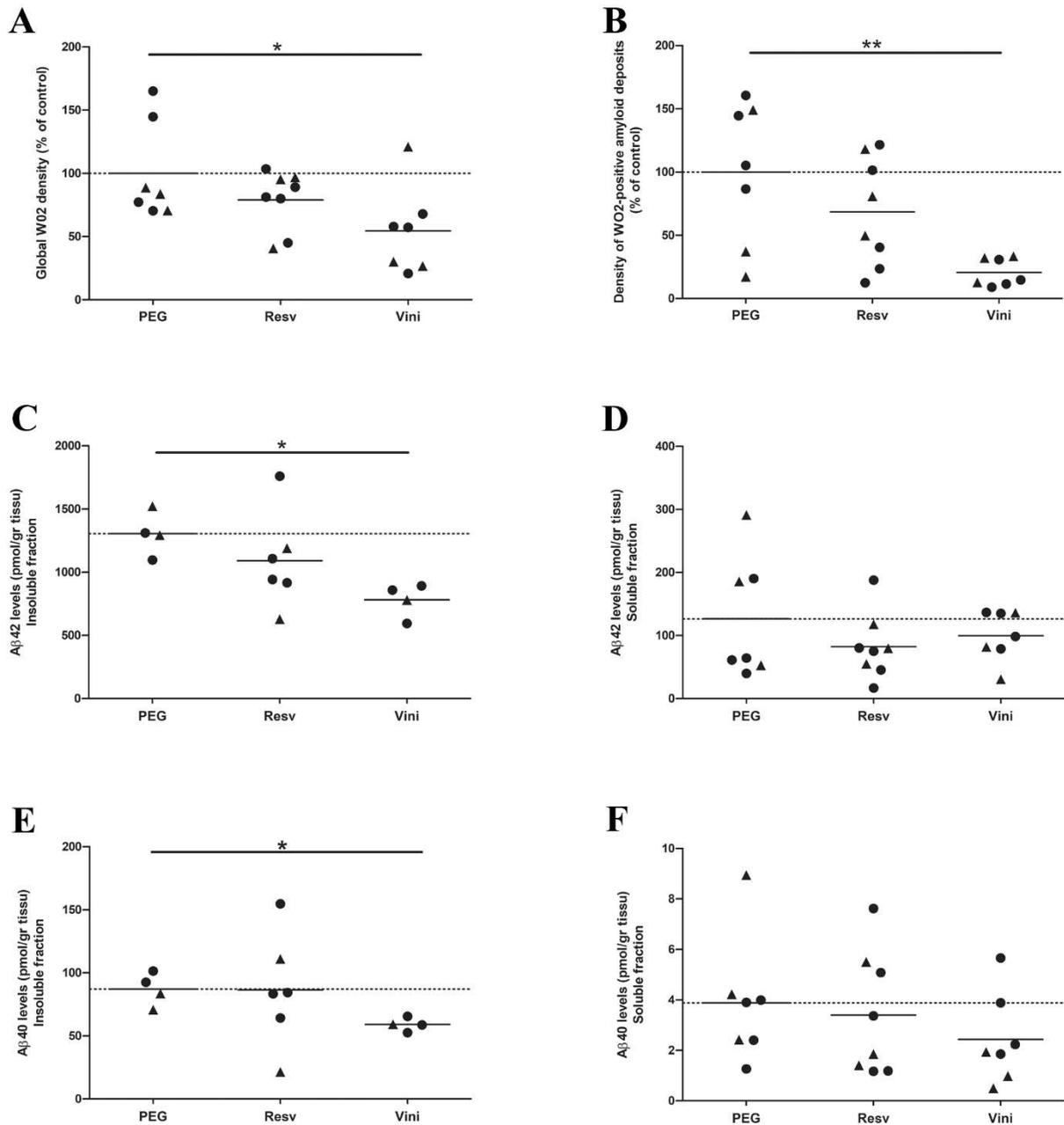


Fig 2. Effects of resveratrol and viniferin on hippocampal amyloid load and deposits.

For all AD mice, the quantification of global signal WO2 and of only amyloid deposits were represented in panels **A** and **B**, respectively. The hippocampal levels of insoluble fraction (**C**) and soluble fraction (**D**) of Aβ42 and those of Aβ40 (**E** and **F**, respectively) were quantified using ELISA. The line represents the mean of the vehicle group and the results were expressed as percentage of control (rounds represent females, triangles represent males). To compare values between PEG- and polyphenol-treated-mice (by *trans*-resveratrol or *trans* ε-viniferin), the Mann-Whitney test was used, (n = 4 to 8). **p < 0.005, *p < 0.05 compared to PEG-treated AD mice (control mice).

Moreover, the quantification of C-terminal fragment of APP protein, C99, generated by the initial APP cleavage by β-secretase, was determined in the hippocampus of AD mice by western blot.

Viniferin induced a significant decrease by 44% of C99 in the hippocampus of viniferin-treated

mice in comparison of vehicle-treated mice ($p < 0.05$ Fig 3). However, no significant differences were observed between resveratrol-treated mice and viniferin-treated mice.

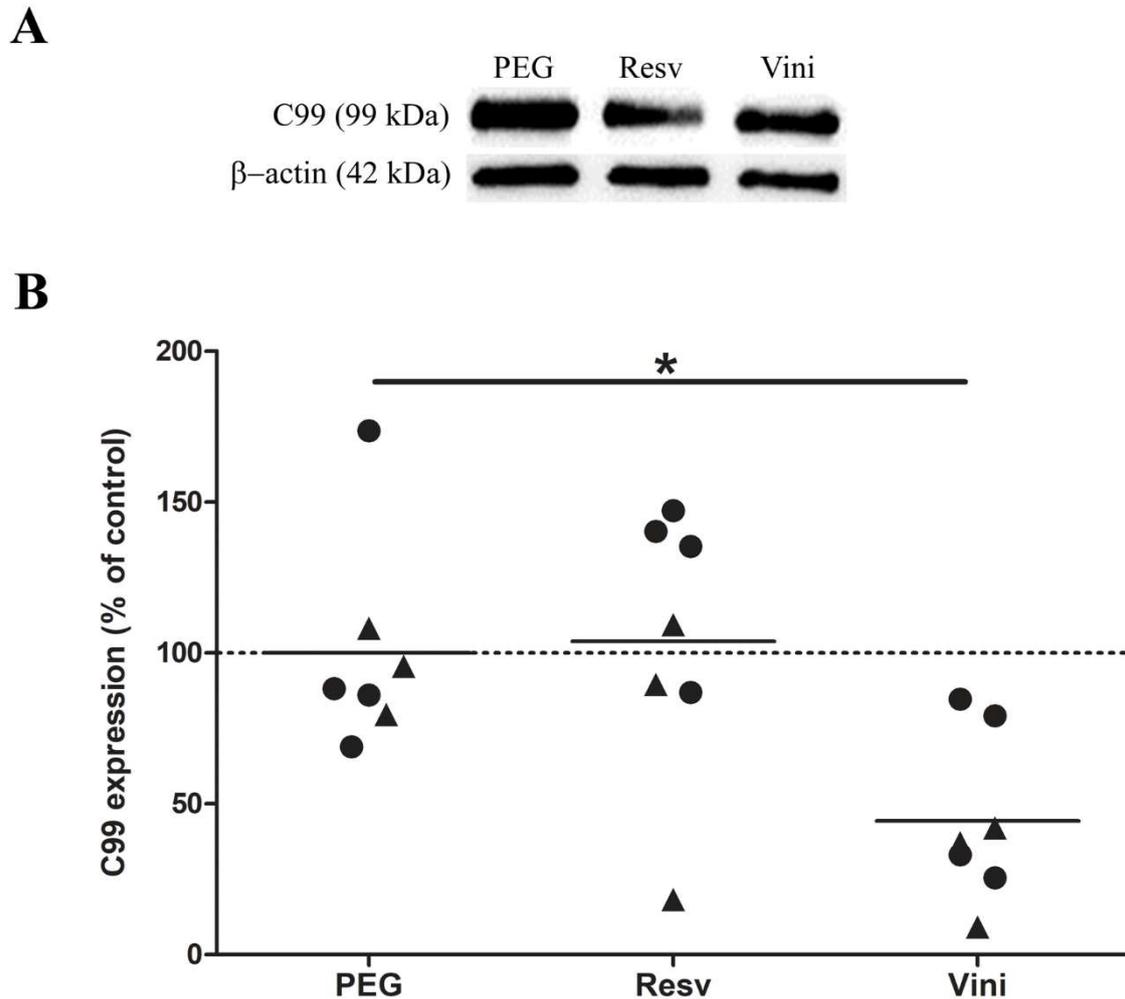


Fig 3. Effects of resveratrol and viniferin on hippocampal expression of C terminal fragment of APP protein.

For all AD mice, the C terminal fragment of APP protein (C99) and β -actin signals were observed in blot (panel A). The C99 / β -actin ratios were calculated and shown in panel B. The means of C99 expression were represented for all groups. The results were expressed as percentage of PEG-treated mice as controls (rounds represent females, triangles represent males). The dotted line represents 100% signal. To compare values between PEG- and polyphenol-treated mice (by *trans*-resveratrol or *trans* ϵ -viniferin), the Mann-Whitney test was used ($n = 7$). * $p < 0.05$ compared to control.

The PET-Scan analysis of [^{18}F]Florbetaben binding in the hippocampus showed a significant decrease in viniferin-treated mice compared to controls (Vini vs. PEG, $p < 0.0001$ Fig 4A).

However, this decrease was also shown in resveratrol-treated mice compared to controls (Resv vs. PEG, $p < 0.05$ Fig 4A).

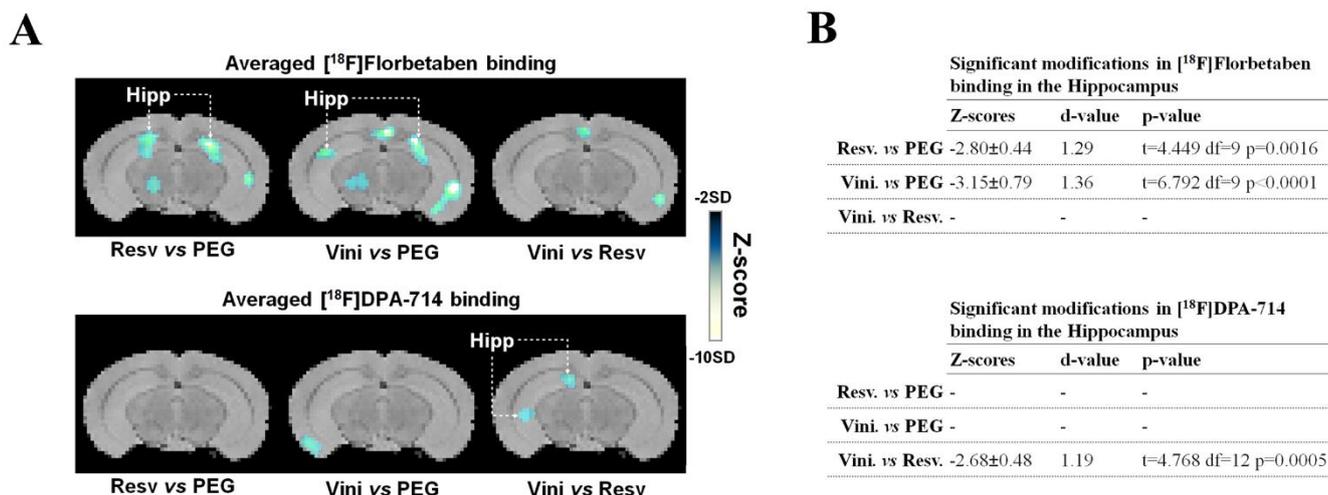


Fig 4. Changes in hippocampal [¹⁸F]Florbetaben and [¹⁸F]DPA-714 and binding in AD mice.

A. Coronal images of significant differences in [¹⁸F]Florbetaben and [¹⁸F]DPA-714 and binding (z-score maps; decreases in tracer binding from dark to white; Student unpaired *t*-test; $p < 0.01$) in AD mice fused with an MRI template in 3 conditions: from left to right Resv vs PEG, Vini vs PEG and Vini vs Resv. **B.** Tables resuming the statistical differences in [¹⁸F]Florbetaben and [¹⁸F]DPA-714 and binding for the 3 treatment conditions. The z-score and d-value are presented for each significant difference observed along with the *t*, *df* and *p* values of the unpaired *t*-test. Hipp, hippocampus; PEG, polyethylene glycol 200; Resv, *trans*-resveratrol; Vini, *trans* ϵ -viniferin.

3.2 Effect of viniferin in the reactivity of astrocytes and microglia in AD mice

The reactivity of hippocampal astrocytes and microglial cells has been evaluated by quantifying the immunolabeling of GFAP and IBA-1, respectively (Fig 1). In contrast to amyloid deposits, the intensity of these markers for astrocytes and microglia was unchanged whatever treatment both in AD and WT mice (Figs 5A, B). GFAP immunoreactivity decreased by 25% in viniferin-treated AD mice compared to vehicle-treated AD mice, whereas it was similar in all WT groups (Fig 5C-4E). IBA1 immunoreactivity was similar in all WT and AD groups despite a slight decrease by 21% of IBA1 expression in viniferin-treated AD mice compared to resveratrol treated AD mice (Fig 5D-4F). This last result concerning microglial marker was partially supported by the PET-Scan analysis of the TSPO tracer [¹⁸F]DPA-714 binding which is an index of microglia reactivity in the hippocampus. Indeed, no difference in the tracer accumulation was observed between the Vini and PEG groups and the Resv and PEG groups (Fig 4B). However, a significant decrease of tracer binding was observed between viniferin- and resveratrol-treated mice ($p < 0.0005$ Fig 4B).

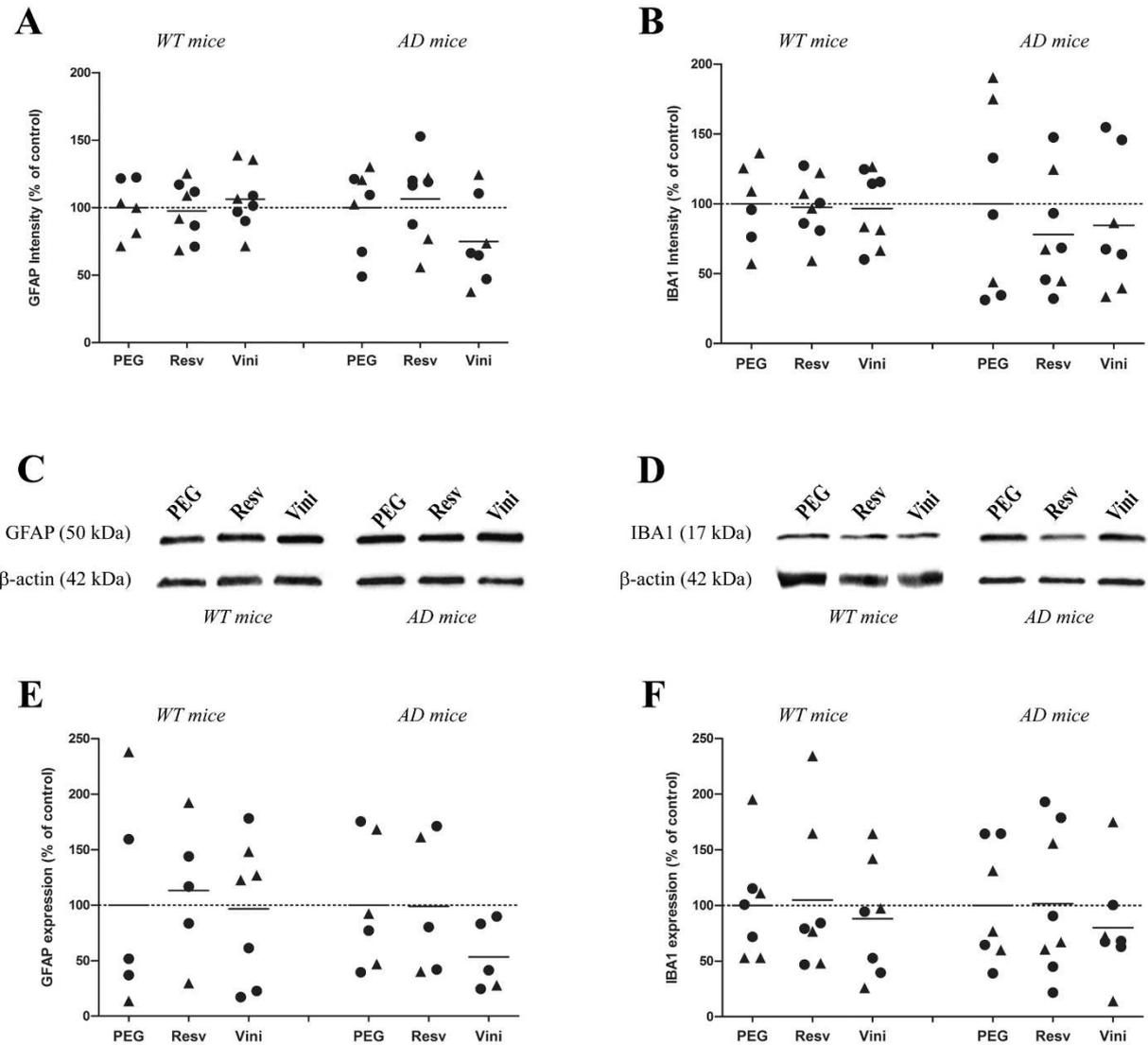


Fig 5. Effects of resveratrol and viniferin on hippocampal expression of GFAP and IBA-1.

The immunofluorescent GFAP and IBA-1 signals observed in Figure 1 were quantified and represented in panels **A** and **B**, respectively. The GFAP and IBA-1 blots were shown in panel **C** and **D**, respectively, as well as corresponding β -actin signals. The GFAP / β -actin and IBA-1 / β -actin ratios were calculated and shown in the panels **E** and **F**, respectively. The means of GFAP and IBA-1 levels were represented for all groups. The results were expressed as percentage of PEG-treated mice as controls (rounds represent females, triangles represent males). The dotted line represents 100% signal. To compare values between PEG- and polyphenol-treated-mice (by *trans*-resveratrol or *trans*- ϵ -viniferin), the Mann-Whitney test was used ($n=5$ to 8). Any significant result was observed.

Moreover, IBA1-positive microglia displayed a more stained cell body and very thin ramifications with a weak IBA1 signal in AD mice (**Fig 6B**) compared to WT mice (**Fig 6A**) whatever treatment. All these results show that both viniferin and resveratrol did not modify the reactivity of astrocytes and microglia in AD mice at 11 months of age.

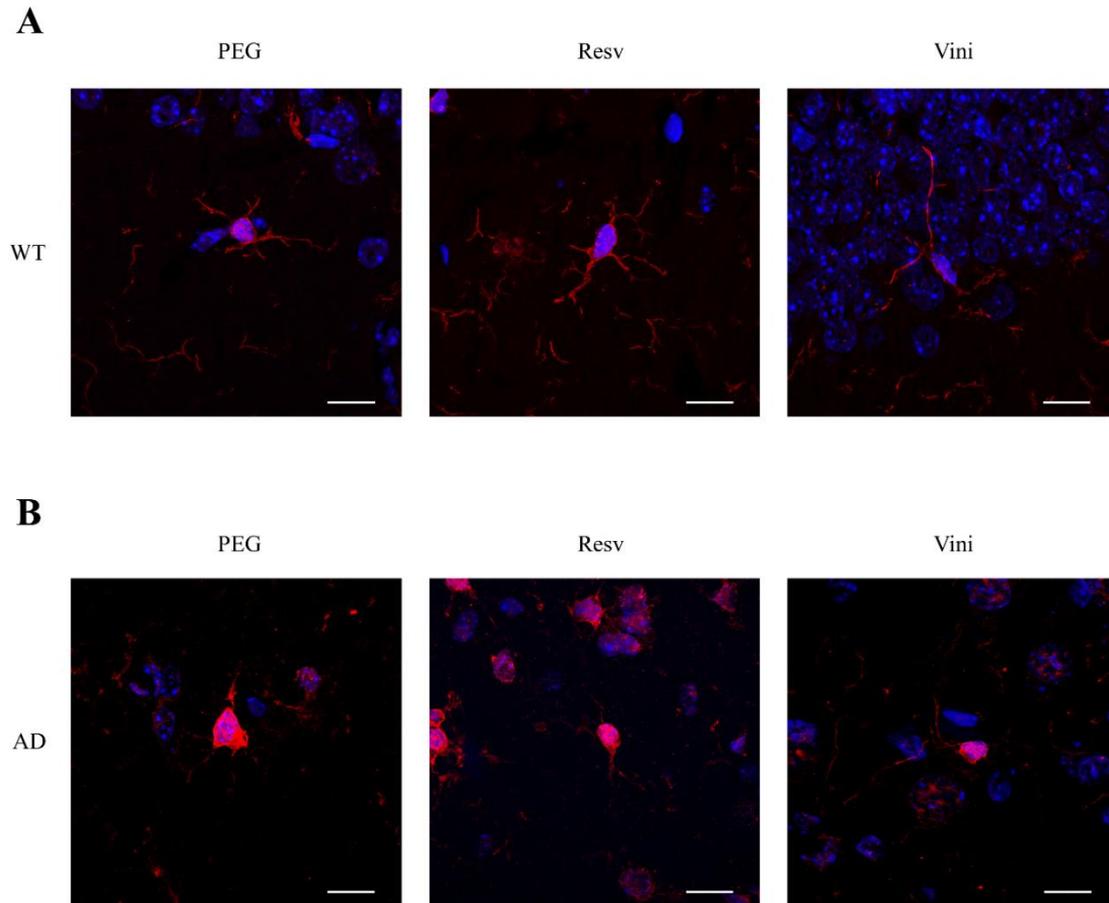


Fig 6. Effects of resveratrol and viniferin on hippocampal microglia morphology.

The WT mice and the double transgenic APP^{swe}PS1^{dE9} mice were treated by resveratrol, *trans* ϵ -viniferin or their vehicle (PEG 200) intraperitoneally from 7 to 11 months of age. Microglia was stained with antibody against IBA-1 (red) and nuclei with DAPI (blue). Panels **A** and **B** represent confocal images of hippocampus from WT and AD mice, respectively. Scale bars: 150 μ m.

3.3 Partial improvement of spatial memory decline by polyphenols in AD mice

In order to evaluate the spatial memory of mice, the MWM test was performed, before the beginning of treatment (at 7 months) and after the last injection (at 11 months). For each WT and AD mouse groups, no difference in swimming speed was observed at the start and the end of the study (Fig 7A). Neither the treatment nor the aging induced modification of the motor capacities of mice in both groups. However, one may note that AD mice presented a significant lower swimming speed than WT mice early to the start of the study (Fig 7A). Finally, after analyzing the relative variation of the retention time between 7 and 11 months, WT mice presented a similar positive variation in three groups. In vehicle-treated AD mice, a negative relative variation (-

15,2%) was observed whereas in resveratrol- and viniferin-treated AD mice, this variation of the retention time between the start and the end of the treatment became positive (+19,7% Fig 7B). Treatments with polyphenols partially improve the cognitive decline in AD mice.

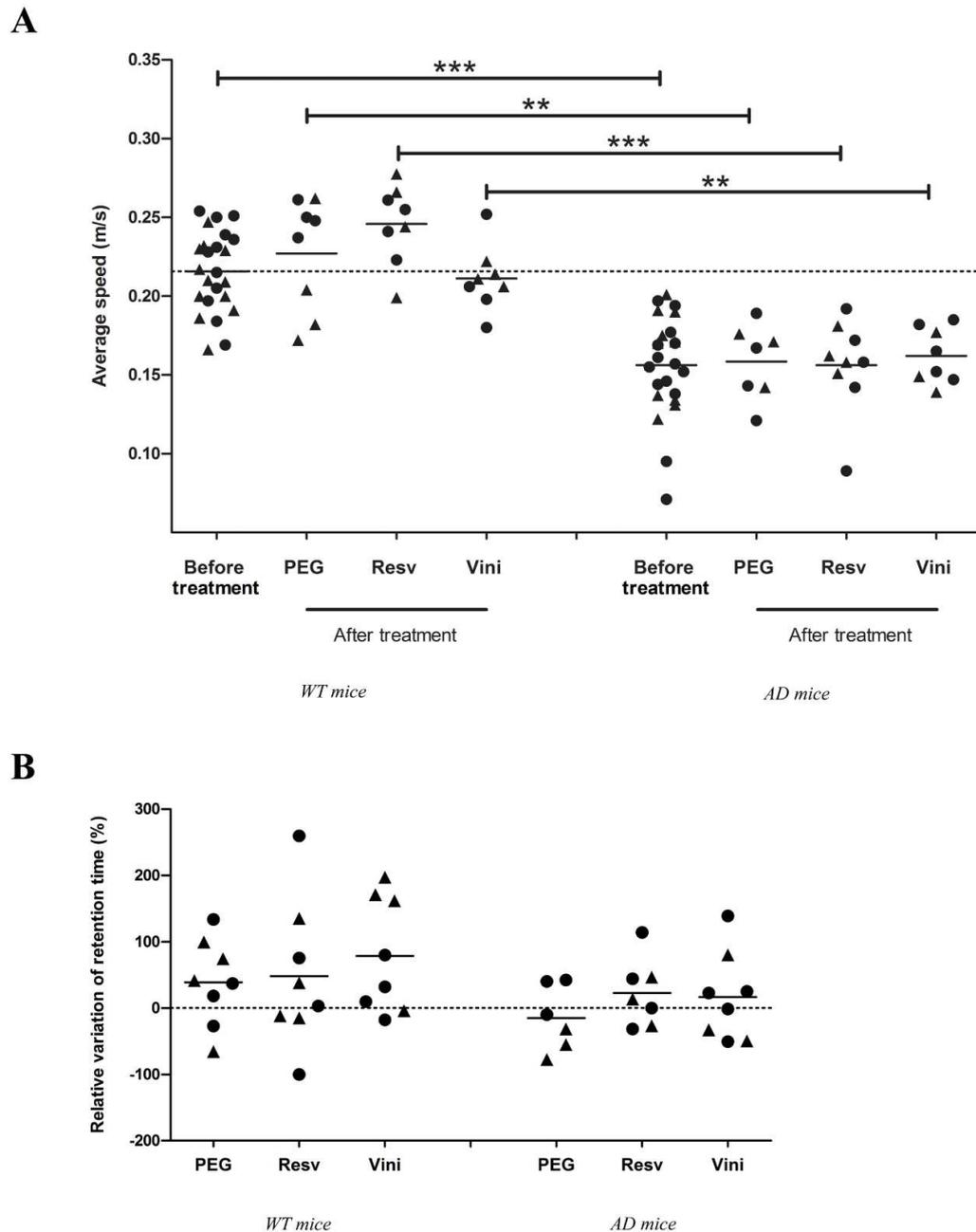


Fig 7. Effects of resveratrol and viniferin on motor capacities and memory decline.

The average speed of WT and AD mice was measured before and after treatment and was represented on panel **A**. The relative variation of retention time expressed as percentage between the beginning and the end of treatment was quantified for WT and AD mice and was represented on the panel **B**. To compare values of average speed and relative variation of retention time, the Mann-Whitney test was used, (n= 7 to 24). ***p < 0.0001, **p < 0.005, compared to each treatment between WT and AD treated mice.

4. Discussion

The aim of this work was to compare effects of resveratrol and viniferin in a murine model of AD displaying some histopathological lesions of this disease. These polyphenols were evaluated both on the amyloid deposits, the reactivity of astrocytes and microglia and the cognitive decline. We already showed in this model that viniferin administrated at 10 mg/kg by i.p. injection once a week from 3 until 6 months of age, partially prevented the formation of amyloid deposits, and decreased the reactivity of astrocytes and microglia [18]. However, these results only demonstrated preventive effects of this stilbene on APP^{swe}PS1^{dE9} mice and have not been compared to those of resveratrol. Indeed, these transgenic mice develop beta-amyloid deposits in brain by 4 to 6 months of age with a neuroinflammation and cognitive impairment at 12 months [48–50], supporting the preventive effect of viniferin on the appearance of amyloid deposits [18].

Thus, in the present study, AD and WT mice were treated by resveratrol or viniferin, at 20 mg/kg, or their vehicle, the PEG-200, by i.p. injections once a week from 7 until 11 months, when amyloid deposits were already present. Moreover, it was necessary to determine the effects of viniferin on memory decline in comparison to the resveratrol.

In this mouse model of AD, it has already been shown that resveratrol (16 mg/kg/day) reduced thioflavin S-positive senile plaque after 10 months of treatment [51]. In the same animal model, immunohistochemistry results showed that viniferin 20 mg/kg/week during 4 months) significantly reduced amyloid deposits in the hippocampus while resveratrol did not. Thus, viniferin seems to decrease amyloid deposits more quickly than resveratrol. Amyloid deposits in these mice were also investigated using PET imaging with [¹⁸F]Florbetaben. Previous studies using this tracer showed an increased radioactivity in Tg vs WT age-matched living mice from 12 months of age in the cortex [52] and hippocampus [53]. Using a quantification method that we previously developed [54] the PET data showed that viniferin but also resveratrol decreased [¹⁸F]Florbetaben binding in the hippocampus after 4 months of treatment. It has been shown that

[¹⁸F]Florbetaben is a reliable index of β -amyloid load as it has been shown to have a better affinity for dense fibrillary than for diffuse plaques [55]. Thus, the apparent discrepancy between immunofluorescence and *in vivo* PET experiments could be related to the fact that the PET-scan analysis considers the entire volume of brain regions, whereas only brain sections were analyzed by immunofluorescence.

We also showed that viniferin treatment decreased insoluble forms of A β , whereas resveratrol treatment did not show significant results. The insoluble forms are generated from the β -sheet and give to the amyloid protein its compact, stable, and insoluble appearance. [56–58]. Therefore, the significant decrease of the insoluble fraction in viniferin treated mice agrees with the decrease in amyloid deposits observed by immunofluorescence and by PET-scan imaging. This result was previously described *in vitro*, showing that viniferin induced the disaggregation of A β 42 peptide [22]. The resveratrol did not show a significant effect on insoluble fraction which again agrees with the previous results. However, *in vitro*, resveratrol is known to not prevent oligomer formation [59]. These oligomers, are an association of peptides which can adopt heterogeneous morphologies, complicating their analysis. Thus, we find in the literature under the name of oligomers both small oligomers (dimer / trimer / tetramer / pentamer / hexamer), larger oligomers (dodecamer: A β 56) but also protofibrils and fibrils of which the number of monomers constituting them is unknown [60–62]. In the progression of AD, soluble monomeric A β peptides are recognized as the primary toxic forms. It has been proved for a long time that the soluble A β oligomers (A β Os), isolated from AD patients' brains, reduced the number of synapses, inhibited the long-term potentiation, and enhanced the long-term synaptic depression in brain regions of memory in animal models of AD [63–65]. Several studies hypothesized that the soluble A β Os could be sequestered within A β plaques until they reach a maximal saturation. Then, A β Os diffuse onto synaptic membranes leading to a harmful cascade damaging neurons and synapses. Although this decrease was not found in the soluble fraction, it is important to emphasize that both soluble

A β 40 and A β 42 levels did not increase with the treatments and that viniferin is able to reduce insoluble forms of A β more effectively than resveratrol. These results can be partially supported by interaction of viniferin with amyloid peptide. Indeed, it has been proved that viniferin interfere with β -sheet to exert its activity [21, 66]. Moreover, this absence of increase in soluble A β levels could be also partly explained by a modification of APP metabolism leading to A β .

Interestingly, results showed that viniferin decreased the C99 fragment expression in AD mice. A β is derived from the APP protein by the action of two aspartyl proteases. APP is first cleaved by the β -secretase (BACE1) allowing the release of its large ectodomain APPs β into the luminal area, and leaving a membrane bound C-terminal fragment. This C99 amino acid fragment is subsequently cleaved by γ -secretase, and causing A β released [67, 68]. Therefore, the decrease of the C99 fragment expression could be explained by a reduction of BACE1 activity. Indeed, such inhibition of BACE1 enzymatic activity by polyphenols was already described *in vitro* and *in silico* but viniferin's action on BACE 1 activity was never tested *in vivo* [69–71]. However these results were different from the study of *Porquet and collaborators*, showing a decrease of the BACE 1 expression levels and no modification of C99 expression levels after resveratrol treatment [51]. Here, resveratrol has no effect on C99 expression. Although this difference can be explained by a different dose and a longer treatment duration, this result could suggest a change of the APP's metabolism by decreasing the amyloidogenic pathway, mediated by BACE1 activity.

Increasing evidence suggests that neuroinflammation contributes to the pathogenesis of AD. Indeed, in APP^{swe}PS1^{dE9} mice, clustered of astrocytes and microglia were observed in hippocampus and cortex after 6 months of age, and continued to progress with age [50]. Moreover, activation and accumulation of glial cells and astrocytes around amyloid plaques has been already studied and described in AD patients [72–74]. To assess the action of viniferin in AD on glial cells, the use of IBA-1 and TSPO markers expressed in microglia, and GFAP and TSPO markers expressed in reactive astrocytes were tested.

In the present study, no significant difference was observed for GFAP and IBA-1 markers in AD and WT mice whatever treatment. These results disagree with the literature, where GFAP protein levels are reduced by resveratrol as IBA-1 [75–77]. The evaluation of TSPO density is now well-recognized as a relevant index of microglial activation [78]. We measured this biomarker by PET imaging using [¹⁸F]DPA-714 in each mouse previously explored with [¹⁸F]Florbetaben, as already performed in this animal model [40]. We did not detect modification of the signal in both groups of treated *vs.* control mice, but interestingly, a significant decrease in this signal was measured for the viniferin-treated group *vs.* resveratrol-treated group. If the TSPO PET imaging has already allowed to longitudinally follow the neuroinflammatory process in Tg mice models of AD [40, 79, 80], the present study demonstrates for the first time that such an *in vivo* method is suitable for evaluating long-term treatment effects.

The absence of effects observed in both treatment conditions compared to controls by immunofluorescence, western blot and PET imaging, could be related to a recently discovered side effect of the vehicle, the PEG 200. Indeed, we have demonstrated that PEG 200, administrated IP once a week at the dose of 1.67 mL/kg, induced a hippocampal inflammation in WT mice. Thus, we have shown that the chronical administration of this molecule led to an increase of astrocytes and microglia and of both of GFAP and IBA-1 expressions in the hippocampus of these mice. Moreover, it increases IL-1 β expression (data submitted). Following this discovery, it unfortunately seems impossible to correctly interpret effects of polyphenols on hippocampal inflammation, because PEG 200 side effect reduces potential anti-inflammatory actions of them. However, the PET imaging exploration demonstrates a significant decrease of [¹⁸F]DPA-714 tracer binding between viniferin- and resveratrol-treated mice. Although the effects of PEG 200 has not been tested on the TSPO expression, the difference observed between the treatments by PET imaging suggests a stronger action of viniferin rather than resveratrol on neuroinflammation. In this study, the used of IBA-1 as main marker of microglia can be discussed. Indeed, IBA-1

stains both resting and activated cells [81]. Several studies used CD68, a common marker for macrophage lineage cells and primarily localized into microglia, and perivascular macrophages [82]. CD68 labels the lysosome and is therefore commonly considered a marker of activated phagocytic microglia. Its expression was positively correlated to cognitive decline [83]. The use of this marker would be more judicious to compare these results with the TSPO used in PET-scan imaging, as previously done in another study [40].

While an inflammatory response was not clearly identified by the treatments due to side effects of PEG, a morphological difference of IBA1-positive cells between AD and WT mice was observed. Ramified microglia reflecting a “resting” or an inactive state was observed in WT mice, rather than “dystrophic microglia” was shown in AD mice. This last form of microglia was described in literature to have phagocytic capacities and cytokine secretion [84]. Moreover, this morphological aspect reflects a microglia dysfunction due to ageing and found in AD patients [85]. Despite this result, any morphological difference was observed by confocal microscopy between AD mice treated by the vehicle or polyphenols. However, it could be interesting to deeply pursue this analysis because a change of cellular morphology could be observed at different stages of AD, involving several forms of active microglia [86].

During the progression of AD, deficits have been reported across cognitive domains and more precisely on spatial learning [87]. Indeed, until 7 months, spatial memory of AD mice is comparable to that of WT mice, but it is impaired at 12 months as measured by performance in the MWM [88]. In this study, the spatial memory test was conducted to assess learning and spatial memory in AD and WT treated mice. Before treatment and after treatment, a significant difference was observed in the swimming speed between AD and WT mice. These motor impairments in AD mice could coincide with the development of AD related lesions within the motor regions of the CNS, although another study has shown no difference in motor function of APP^{swe}PS1^{dE9} mice [87]. In our study, no significant difference was observed in the swimming speed, between 7 and

11 months, for both WT and AD mice, indicating that neither age nor treatment impaired the motor capacities. Moreover, after treatment, the difference in swimming speed between AD and respective WT groups remain significative, indicating that treatment did not improve swimming speed. About the relative variation of the retention time between 7 and 11 months, a positive value was calculated for WT mice whatever treatment, suggesting good mnesic learning. On the contrary, a negative variation of this retention time was calculated in the vehicle-treated AD mice, which spend less time in the target quadrant than the polyphenols-treated AD mice. This negative variation could be the sign of cognitive decline found in AD, while treatment by resveratrol or viniferin could partially improve this cognitive decline as described for resveratrol in literature [30, 89]. However, absence of significance can be explained by the small number of animals in each group and variability of data.

To conclude, viniferin is a polyphenol which possesses beneficial properties for AD stronger than resveratrol. Indeed, a significant decrease of amyloid deposits (-79%) and a partially protection of cognitive decline (+19,7%) were observed for the first time on an AD mouse model. Unfortunately, the impact of polyphenols on glial reactivity could not be observed owing to the vehicle used for this study, PEG 200, which was proved to be unsuitable by inducing hippocampal inflammation (data submitted). However, the significant decrease in the TSPO density measured by PET imaging by viniferin compared to resveratrol once again highlighted that viniferin is also more effective than resveratrol against glial reactivity. Other studies involving viniferin may therefore be considered in the future to study the effect on viniferin in AD for example oral treatment of viniferin to avoid neuroinflammatory effects of PEG.

Ethics Approval and animal rights

The use of animals was approved by the Ethical and Animal Care Committee (N°84 COMETHEA, Ethical Committee for Animal Experimentation) Poitou-Charentes, France) and by the French

ministry (agreement number: 2015072717461531 to Pr Guylène Page as designer of experimental projects on animals for scientific purposes) and agreement APAFIS#13481-2018.013115261004.V3 for imaging experiments. All animal care and experimental procedures conformed with the French Decret number 2013–118, 1 February 2013 NOR: AGRG1231951D in accordance to European Community guidelines (directive 2010/63/UE).

Declaration of conflict of interest

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Acknowledgements

This work has benefited from the facilities and expertise of PREBIOS platform (University of Poitiers, France). This research receives specific grant from SFR FED 4226 (Structure Federative de Recherche) and benefited from the university endowment allocated to the EA3808 laboratory and help provided by Labex IRON (ANR-11-LABX-18-01). The authors thank Dr Johnny Vercouillie and Gabrielle Chicheri (UMR 1253, iBrain, University of Tours), and CERRP (Centre d'Etudes et de Recherches sur les Radiopharmaceutiques, University of Tours) for the preparation of PET tracers, Damien Chassaing (EA3808 Neurovascular Unit and Cognitive Disorders, University of Poitiers), Sylvie Bodard (UMR 1253, iBrain, University of Tours) and Julie Godet (Poitiers University Hospital) for their technical skills. The authors also thank the LNEC Inserm U1084 laboratory (Dir: M. Jaber) for the loan and advice of the videotrack system for automation of behavioral animal experiments.

DATA SUPPLEMENTARY

Table 1: Chemical products used in the current study

Chemical product	Company
Sodium fluoride (NaF), Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Protease and phosphatase inhibitor cocktails, Dithiothreitol (DTT), Paraformaldehyde (PFA), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), all reagent-grade chemicals for buffers	Sigma (St Quentin Fallavier, France)
Ketamidol® (Ketamine) and 2% Rompun® (Xylazine)	Coveto (Montaigu, France)
Protease-Free Bovine Serum Albumin (BSA)	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd (Interchim distributor, France)
Laemmli Sample Buffer, 4-20% Tris-Glycine gels, Tris-Glycine SDS Running Buffer, Precision plus protein™ standards All blue, Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-rad (Marnes-la Coquette, France)
Amyloid ELISA kit	Gibco-Invitrogen (Fisher Bioblock Scientific distributor, France)
Guanidine	Acros Organics (USA)
Absolute ethanol	Carlo Erba Reagents Rodano (France)
Histosol plus	Shandon (France)
<i>Trans</i> ϵ -viniferin and <i>trans</i> -resveratrol	Locally extracted and purified
Mouse antibody anti amyloid peptide (clone W02), Chemiluminescence Luminata Forte and Classico Substrates	Millipore (Saint-Quentin-en- Yvelines, France)
Rabbit antibody anti GFAP, Donkey antibody anti goat IgG-HRP, Goat antibody anti rabbit IgG-HRP, Horse antibody anti mouse IgG-HRP	Cell Signaling Technology (Ozyme, France))
Goat antibody anti IBA-1	Abcam (France)
Mouse antibody anti β -actin	Sigma Aldrich (Merck-Millipore, France)
Donkey antibodies anti-mouse-Alexa 488, anti-rabbit-RRX, anti-goat RRX	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd (Interchim distributor, France)

5. References

- [1] Prince MJ. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia, Available from: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>.
- [2] Alzheimer's Association. 2020 Alzheimer's Disease Facts and Figures Facts and Figures, Available from: <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/facts-figures>.
- [3] Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 179(2): 312–339 (2019).
- [4] Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis JAD*. 57(4): 1105–1121 (2017).
- [5] Webers A, Heneka MT, Gleeson PA. The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease. *Immunol Cell Biol*. 98(1): 28–41 (2020).
- [6] Singh R, Sadiq NM. Cholinesterase Inhibitors. In *StatPearls*. StatPearls Publishing: Treasure Island (FL) (2020).
- [7] Alam S, Lingenfelter KS, Bender AM, Lindsley CW. Classics in Chemical Neuroscience: Memantine. *ACS Chem Neurosci*. 8(9): 1823–1829 (2017).
- [8] Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*. 76 Pt A: 27–50 (2014).
- [9] Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol*. 9(7): 702–716 (2010).
- [10] Pedersen JT, Sigurdsson EM. Tau immunotherapy for Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*. 21(6): 394–402 (2015).
- [11] van Dyck CH. Anti-Amyloid- β Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise. *Biol Psychiatry*. 83(4): 311–319 (2018).
- [12] Ali MM, Ghouri RG, Ans AH, Akbar A, Toheed A. Recommendations for Anti-inflammatory Treatments in Alzheimer's Disease: A Comprehensive Review of the Literature. *Cureus*. 11(5): e4620 (2019).
- [13] Charembon T, Jaisin K. Ginkgo biloba for prevention of dementia: a systematic review and meta-analysis. *J Med Assoc Thail Chotmaiht Thangphaet*. 98(5): 508–513 (2015).
- [14] Wojsiat J, Zoltowska KM, Laskowska-Kaszub K, Wojda U. Oxidant/Antioxidant Imbalance in Alzheimer's Disease: Therapeutic and Diagnostic Prospects. *Oxid Med Cell Longev*. 2018: 6435861 (2018).
- [15] Mecocci P, Polidori MC. Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 1822(5): 631–638 (2012).
- [16] Dhakal S, Kushairi N, Phan CW, Adhikari B, Sabaratnam V, Macreadie I. Dietary Polyphenols: A Multifactorial Strategy to Target Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 20(20) (2019).
- [17] Capiralla H, Vingtdoux V, Zhao H, Sankowski R, Al-Abed Y, Davies P, *et al*. Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and A β -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- κ B/STAT signaling cascade. *J Neurochem*. 120(3): 461–472 (2012).

- [18] Caillaud M, Guillard J, Richard D, Milin S, Chassaing D, Paccalin M, *et al.* Trans ϵ viniferin decreases amyloid deposits and inflammation in a mouse transgenic Alzheimer model. *PloS One*. 14(2): e0212663 (2019).
- [19] Román GC, Jackson RE, Gadhia R, Román AN, Reis J. Mediterranean diet: The role of long-chain ω -3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease. *Rev Neurol (Paris)*. 175(10): 724–741 (2019).
- [20] Ladiwala ARA, Lin JC, Bale SS, Marcelino-Cruz AM, Bhattacharya M, Dordick JS, *et al.* Resveratrol selectively remodels soluble oligomers and fibrils of amyloid Abeta into off-pathway conformers. *J Biol Chem*. 285(31): 24228–24237 (2010).
- [21] Freysson A, Page G, Fauconneau B, Rioux Bilan A. Natural polyphenols effects on protein aggregates in Alzheimer’s and Parkinson’s prion-like diseases. *Neural Regen Res*. 13(6): 955–961 (2018).
- [22] Vion E, Page G, Bourdeaud E, Paccalin M, Guillard J, Rioux Bilan A. Trans ϵ -viniferin is an amyloid- β disaggregating and anti-inflammatory drug in a mouse primary cellular model of Alzheimer’s disease. *Mol Cell Neurosci*. 88: 1–6 (2018).
- [23] Sureda A, Capó X, Tejada S. Neuroprotective Effects of Flavonoid Compounds on Neuronal Death Associated to Alzheimer’s Disease. *Curr Med Chem*. 26(27): 5124–5136 (2019).
- [24] Bureau G, Longpré F, Martinoli M-G. Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *J Neurosci Res*. 86(2): 403–410 (2008).
- [25] Kou X, Chen N. Resveratrol as a Natural Autophagy Regulator for Prevention and Treatment of Alzheimer’s Disease. *Nutrients*. 9(9) (2017).
- [26] Sawda C, Moussa C, Turner RS. Resveratrol for Alzheimer’s disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1403(1): 142–149 (2017).
- [27] Chen J-Y, Zhu Q, Zhang S, OuYang D, Lu J-H. Resveratrol in experimental Alzheimer’s disease models: A systematic review of preclinical studies. *Pharmacol Res*. 150: 104476 (2019).
- [28] Turner RS, Thomas RG, Craft S, van Dyck CH, Mintzer J, Reynolds BA, *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. *Neurology*. 85(16): 1383–1391 (2015).
- [29] Moussa C, Hebron M, Huang X, Ahn J, Rissman RA, Aisen PS, *et al.* Resveratrol regulates neuro-inflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer’s disease. *J Neuroinflammation*. 14(1): 1 (2017).
- [30] Chen Y, Shi G-W, Liang Z-M, Sheng S-Y, Shi Y-S, Peng L, *et al.* Resveratrol improves cognition and decreases amyloid plaque formation in Tg6799 mice. *Mol Med Rep*. 19(5): 3783–3790 (2019).
- [31] Kennedy DO, Wightman EL, Reay JL, Lietz G, Okello EJ, Wilde A, *et al.* Effects of resveratrol on cerebral blood flow variables and cognitive performance in humans: a double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. *Am J Clin Nutr*. 91(6): 1590–1597 (2010).

- [32] Drygalski K, Fereniec E, Koryciński K, Chomentowski A, Kielczewska A, Odrzygóźdź C, *et al.* Resveratrol and Alzheimer's disease. From molecular pathophysiology to clinical trials. *Exp Gerontol.* 113: 36–47 (2018).
- [33] Boocock DJ, Patel KR, Faust GES, Normolle DP, Marczylo TH, Crowell JA, *et al.* Quantitation of trans-resveratrol and detection of its metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 848(2): 182–187 (2007).
- [34] Vion E, Page G, Bourdeaud E, Paccalin M, Guillard J, Rioux Bilan A. Trans ϵ -viniferin is an amyloid- β disaggregating and anti-inflammatory drug in a mouse primary cellular model of Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci.* 88: 1–6 (2018).
- [35] Jeong HY, Kim JY, Lee HK, Ha DT, Song K-S, Bae K, *et al.* Leaf and stem of *Vitis amurensis* and its active components protect against amyloid β protein (25-35)-induced neurotoxicity. *Arch Pharm Res.* 33(10): 1655–1664 (2010).
- [36] Richard T, Poupard P, Nassra M, Papastamoulis Y, Iglésias M-L, Krisa S, *et al.* Protective effect of ϵ -viniferin on β -amyloid peptide aggregation investigated by electrospray ionization mass spectrometry. *Bioorg Med Chem.* 19(10): 3152–3155 (2011).
- [37] Rivière C, Papastamoulis Y, Fortin P-Y, Delchier N, Andriamanarivo S, Waffo-Teguo P, *et al.* New stilbene dimers against amyloid fibril formation. *Bioorg Med Chem Lett.* 20(11): 3441–3443 (2010).
- [38] Richard T, Papastamoulis Y, Waffo-Teguo P, Monti J-P. 3D NMR structure of a complex between the amyloid beta peptide (1-40) and the polyphenol ϵ -viniferin glucoside: implications in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1830(11): 5068–5074 (2013).
- [39] Caillaud M, Guillard J, Richard D, Milin S, Chassaing D, Paccalin M, *et al.* Trans ϵ viniferin decreases amyloid deposits and inflammation in a mouse transgenic Alzheimer model. *PloS One.* 14(2): e0212663 (2019).
- [40] Sérrière S, Tauber C, Vercouillie J, Mothes C, Pruckner C, Guilloteau D, *et al.* Amyloid load and translocator protein 18 kDa in APP^{swE}PS1-dE9 mice: a longitudinal study. *Neurobiol Aging.* 36(4): 1639–1652 (2015).
- [41] Wang H, Shi H, Yu H, Jiang S, Tang G. Facile and rapid one-step radiosynthesis of [(18F)BAY94-9172 with a new precursor. *Nucl Med Biol.* 38(1): 121–127 (2011).
- [42] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* 57(1): 289–300 (1995).
- [43] Endepols H, Sommer S, Backes H, Wiedermann D, Graf R, Hauber W. Effort-based decision making in the rat: an [18F]fluorodeoxyglucose micro positron emission tomography study. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 30(29): 9708–9714 (2010).
- [44] Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences.* L. Erlbaum Associates: Hillsdale, N.J (1988).
- [45] Couturier J, Paccalin M, Lafay-Chebassier C, Chalon S, Ingrand I, Pinguet J, *et al.* Pharmacological inhibition of PKR in APP^{swE}PS1dE9 mice transiently prevents inflammation at 12 months of age but increases A β 42 levels in the late stages of the Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 9(3): 344–360 (2012).
- [46] Damjanac M, Rioux Bilan A, Barrier L, Pontcharraud R, Anne C, Hugon J, *et al.* Fluoro-Jade B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1128(1): 40–49 (2007).

- [47] François A, Rioux Bilan A, Quellard N, Fernandez B, Janet T, Chassaing D, *et al.* Longitudinal follow-up of autophagy and inflammation in brain of APPswePS1dE9 transgenic mice. *J Neuroinflammation*. 11: 139 (2014).
- [48] Savonenko A, Xu GM, Melnikova T, Morton JL, Gonzales V, Wong MPF, *et al.* Episodic-like memory deficits in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. *Neurobiol Dis*. 18(3): 602–617 (2005).
- [49] Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, Purcell SM, Betensky RA, Raju S, *et al.* Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis*. 24(3): 516–524 (2006).
- [50] Ruan L, Kang Z, Pei G, Le Y. Amyloid deposition and inflammation in APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 6(6): 531–540 (2009).
- [51] Porquet D, Griñán-Ferré C, Ferrer I, Camins A, Sanfeliu C, Del Valle J, *et al.* Neuroprotective role of trans-resveratrol in a murine model of familial Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD*. 42(4): 1209–1220 (2014).
- [52] Rominger A, Brendel M, Burgold S, Keppler K, Baumann K, Xiong G, *et al.* Longitudinal assessment of cerebral β -amyloid deposition in mice overexpressing Swedish mutant β -amyloid precursor protein using 18F-florbetaben PET. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 54(7): 1127–1134 (2013).
- [53] Stenzel J, Rühlmann C, Lindner T, Polei S, Teipel S, Kurth J, *et al.* [18F]-florbetaben PET/CT Imaging in the Alzheimer's Disease Mouse Model APPswe/PS1dE9. *Curr Alzheimer Res*. 16(1): 49–55 (2019).
- [54] Nicolas C, Tauber C, Lepelletier F-X, Chalon S, Belujon P, Galineau L, *et al.* Longitudinal Changes in Brain Metabolic Activity after Withdrawal from Escalation of Cocaine Self-Administration. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 42(10): 1981–1990 (2017).
- [55] Catafau AM, Bullich S, Seibyl JP, Barthel H, Ghetti B, Leverenz J, *et al.* Cerebellar Amyloid- β Plaques: How Frequent Are They, and Do They Influence 18F-Florbetaben SUV Ratios? *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 57(11): 1740–1745 (2016).
- [56] Hong S, Ostaszewski BL, Yang T, O'Malley TT, Jin M, Yanagisawa K, *et al.* Soluble A β oligomers are rapidly sequestered from brain ISF in vivo and bind GM1 ganglioside on cellular membranes. *Neuron*. 82(2): 308–319 (2014).
- [57] Morris GP, Clark IA, Vissel B. Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2: 135 (2014).
- [58] Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, *et al.* Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*. 14(8): 837–842 (2008).
- [59] Feng Y, Wang X, Yang S, Wang Y, Zhang X, Du X, *et al.* Resveratrol inhibits beta-amyloid oligomeric cytotoxicity but does not prevent oligomer formation. *Neurotoxicology*. 30(6): 986–995 (2009).
- [60] Huang TH, Yang DS, Fraser PE, Chakrabarty A. Alternate aggregation pathways of the Alzheimer beta-amyloid peptide. An in vitro model of preamyloid. *J Biol Chem*. 275(46): 36436–36440 (2000).

- [61] Amar F, Sherman MA, Rush T, Larson M, Boyle G, Chang L, *et al.* The amyloid- β oligomer A β *56 induces specific alterations in neuronal signaling that lead to tau phosphorylation and aggregation. *Sci Signal.* 10(478) (2017).
- [62] Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem.* 101(5): 1172–1184 (2007).
- [63] Klein WL, Krafft GA, Finch CE. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci.* 24(4): 219–224 (2001).
- [64] Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, *et al.* Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 27(4): 796–807 (2007).
- [65] Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, *et al.* Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(11): 6448–6453 (1998).
- [66] Francioso A, Punzi P, Boffi A, Lori C, Martire S, Giordano C, *et al.* β -Sheet interfering molecules acting against β -amyloid aggregation and fibrillogenesis. *Bioorg Med Chem.* 23(8): 1671–1683 (2015).
- [67] Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, *et al.* Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature.* 359(6393): 322–325 (1992).
- [68] Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, *et al.* Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature.* 359(6393): 325–327 (1992).
- [69] Shimmyo Y, Kihara T, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H. Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure–activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 1780(5): 819–825 (2008).
- [70] Youn K, Yu Y, Lee J, Jeong W-S, Ho C-T, Jun M. Polymethoxyflavones: Novel β -Secretase (BACE1) Inhibitors from Citrus Peels. *Nutrients.* 9(9): 973 (2017).
- [71] Choi YH, Yoo MY, Choi CW, Cha M-R, Yon GH, Kwon DY, *et al.* A new specific BACE-1 inhibitor from the stem bark extract of *Vitis vinifera*. *Planta Med.* 75(5): 537–540 (2009).
- [72] Prokop S, Miller KR, Heppner FL. Microglia actions in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 126(4): 461–477 (2013).
- [73] Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 16(6): 358–372 (2015).
- [74] Overmyer M, Helisalmi S, Soininen H, Laakso M, Riekkinen P, Alafuzoff I. Astrogliosis and the ApoE genotype. an immunohistochemical study of postmortem human brain tissue. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 10(4): 252–257 (1999).
- [75] Cheng X, Wang Q, Li N, Zhao H. [Effects of resveratrol on hippocampal astrocytes and expression of TNF- α in Alzheimer's disease model rats]. *Wei Sheng Yan Jiu.* 44(4): 610–614 (2015).
- [76] Yao Y, Li J, Niu Y, Yu J-Q, Yan L, Miao Z-H, *et al.* Resveratrol inhibits oligomeric A β -induced microglial activation via NADPH oxidase. *Mol Med Rep.* 12(4): 6133–6139 (2015).

- [77] Bastianetto S, Ménard C, Quirion R. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochim Biophys Acta*. 1852(6): 1195–1201 (2015).
- [78] Chen M-K, Guilarte TR. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther*. 118(1): 1–17 (2008).
- [79] Takkinen JS, López-Picón FR, Al Majidi R, Eskola O, Krzyczmonik A, Keller T, *et al*. Brain energy metabolism and neuroinflammation in ageing APP/PS1-21 mice using longitudinal 18F-FDG and 18F-DPA-714 PET imaging. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 37(8): 2870–2882 (2017).
- [80] Chaney A, Bauer M, Bochicchio D, Smigova A, Kassiou M, Davies KE, *et al*. Longitudinal investigation of neuroinflammation and metabolite profiles in the APP^{swe} ×PS1 Δ e9 transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *J Neurochem*. 144(3): 318–335 (2018).
- [81] Walker DG, Lue L-F. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers Res Ther*. 7(1) (2015).
- [82] Hopperton KE, Mohammad D, Trépanier MO, Giuliano V, Bazinet RP. Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer’s disease: a systematic review. *Mol Psychiatry*. 23(2): 177–198 (2018).
- [83] Minett T, Classey J, Matthews FE, Fahrenhold M, Taga M, Brayne C, *et al*. Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer’s pathology. *J Neuroinflammation*. 13 (2016).
- [84] Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci*. 21(10): 1359–1369 (2018).
- [85] Boche D, Perry VH, Nicoll J a. R. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 39(1): 3–18 (2013).
- [86] Sarlus H, Heneka MT. Microglia in Alzheimer’s disease. *J Clin Invest*. 127(9): 3240–3249.
- [87] Lalonde R, Kim HD, Maxwell JA, Fukuchi K. Exploratory activity and spatial learning in 12-month-old APP(695)SWE/co+PS1/DeltaE9 mice with amyloid plaques. *Neurosci Lett*. 390(2): 87–92 (2005).
- [88] Volianskis A, Køstner R, Mølgaard M, Hass S, Jensen MS. Episodic memory deficits are not related to altered glutamatergic synaptic transmission and plasticity in the CA1 hippocampus of the APP^{swe}/PS1 δ E9-deleted transgenic mice model of β -amyloidosis. *Neurobiol Aging*. 31(7): 1173–1187 (2010).
- [89] Porquet D, Casadesús G, Bayod S, Vicente A, Canudas AM, Vilaplana J, *et al*. Dietary resveratrol prevents Alzheimer’s markers and increases life span in SAMP8. *Age Dordr Neth*. 35(5): 1851–1865 (2013).

1.2 Mise en évidence des effets du PEG 200 administré entre 7 et 11 mois chez des souris sauvages

Suite à l'augmentation des marqueurs de l'inflammation dans l'hippocampe des souris sauvages ayant reçu le PEG 200 dans le volet 1, nous avons suspecté un éventuel effet pro-inflammatoire de ce véhicule. En effet, lors de l'observation par immunofluorescence des astrocytes et de la microglie, marqués respectivement avec des anticorps dirigés contre GFAP et IBA1, aucune différence visuelle n'a été observée au niveau de l'hippocampe des souris APPswePS1dE9 et sauvages, quel que soit le traitement injecté (cf article 1).

Or, ces souris sauvages, qui ont déjà été étudiées au laboratoire dans d'autres projets, ne présentent habituellement pas de neuroinflammation, même à l'âge de 11 ou 12 mois. Dans notre étude utilisant le PEG 200 dilué dans du NaCl 0,9 % comme véhicule, les hippocampes de ces souris sauvages et des souris APPswePS1dE9 présentent un nombre comparable d'astrocytes et de microglie.

A la suite de cette observation surprenante, nous avons donc évalué de façon un peu plus précise l'effet pro-inflammatoire du PEG 200, administré à la dose de 1,67 mL/kg par injection hebdomadaire par voie i.p. Ainsi, nous avons comparé les marqueurs de l'inflammation hippocampique de ces souris sauvages ayant reçu le véhicule PEG 200 à ceux des mêmes souris sauvages du même âge mais n'ayant reçu aucune injection, ces dernières étant des souris incluses dans d'autres projets de recherche du laboratoire.

Traitement	PEG	Non traitées
Nombre de souris	n = 2 ♂ + 4 ♀	n = 1 ♂ + 5 ♀

Table 7 : Nombre de souris sauvages utilisées par traitement dans le volet 1 (traitement de 7 à 11 mois)

La visualisation par immunofluorescence des astrocytes, marqués avec un anticorps dirigé contre la GFAP, montre une augmentation statistiquement significative de l'immunoréactivité des astrocytes hippocampiques chez les souris traitées par le PEG 200. En effet, le nombre d'astrocytes et l'intensité du marquage GFAP sont respectivement 2,5 et 2,3 fois plus élevés dans l'hippocampe des souris ayant reçu le PEG 200 que dans celui des souris n'ayant pas reçu d'injection ($P < 0,05$) (**figure 44**).

En ce qui concerne la microglie, détectée à l'aide d'un anticorps dirigé contre IBA1, nous avons observé une augmentation de l'intensité de marquage d'un facteur qui est significativement

augmenté de 2,5 fois chez les souris traitées par le PEG 200 ($P < 0,05$). La microglie reste néanmoins difficile à mettre en évidence. Cependant, alors qu'aucune cellule microgliale n'a pu être visualisée dans l'hippocampe de souris sauvages non traitées, nous avons observé ces cellules dans l'hippocampe des souris ayant reçu le PEG 200 (**figure 44**).

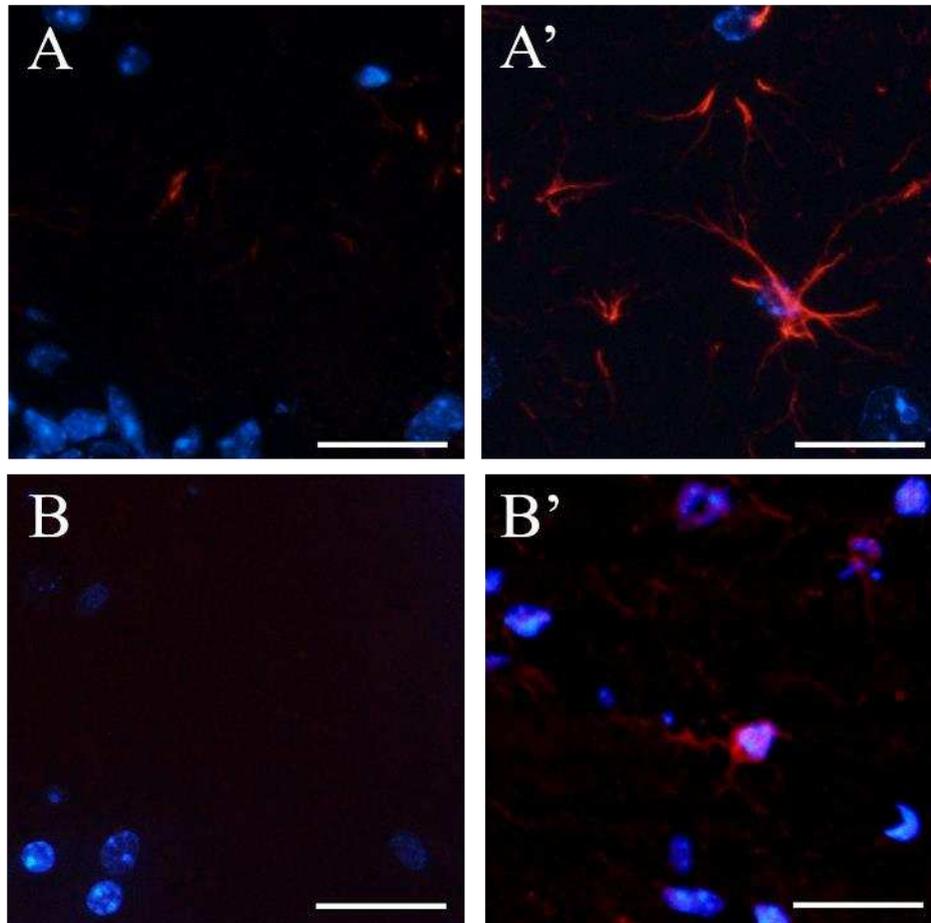


Figure 44 : Marquage par immunofluorescence des cellules de l'inflammation dans l'hippocampe de souris sauvages

Les astrocytes et la microglie ont été marqués en rouge par des anticorps dirigés contre GFAP et IBA1 et les noyaux en bleu par le DAPI

A : Marquage des astrocytes chez une souris sauvage non traitée

A' : Marquage des astrocytes chez une souris sauvage traitée par le PEG 200

B : Marquage de la microglie chez une souris sauvage non traitée

B' : Marquage de la microglie chez une souris sauvage traitée par le PEG 200

Représentation d'une image (X20) avec un zoom (X3). Echelle : 50 μ m

Quant à l'expression hippocampique de la GFAP quantifié par western blot, elle est significativement augmentée d'un facteur 4,3 chez les souris traitées par le PEG 200 par rapport à celles n'ayant pas reçu d'injection ($P < 0,005$) (**figure 45**).

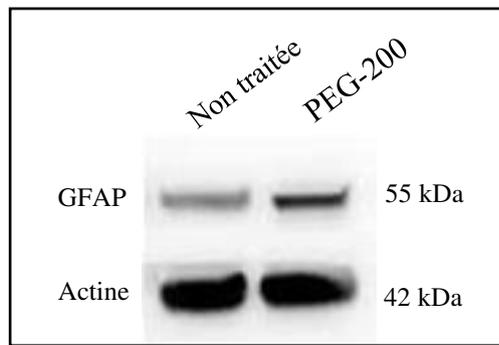


Figure 45 : Expression de la GFAP dans l'hippocampe de souris sauvages

Western blot représentatif du niveau d'expression de la GFAP dans l'hippocampe des souris sauvages non traitées ou traitées par le PEG 200. L'expression de l'actine a permis la normalisation.

Il ne nous a pas été possible de mettre en évidence l'expression d'IBA-1 par western blot. En effet, l'intensité de marquage de la microglie reste modérée. Par ailleurs, nous avons rencontré des problèmes techniques avec cet anticorps lors de son utilisation dans cette partie de l'étude.

Ces résultats ont été complétés par la quantification de la production cytokinique d'IL-1 β au niveau de l'hippocampe. Cette cytokine pro-inflammatoire est elle aussi significativement augmentée de 70 % ($P < 0,005$) dans l'hippocampe des souris traitées par le PEG 200 par rapport aux souris non traitées, ce qui confirme un effet neuroinflammatoire de ce véhicule, à cette dose de 1,67 mL/kg et injecté chroniquement pendant 4 mois de façon hebdomadaire (**figure 46**).

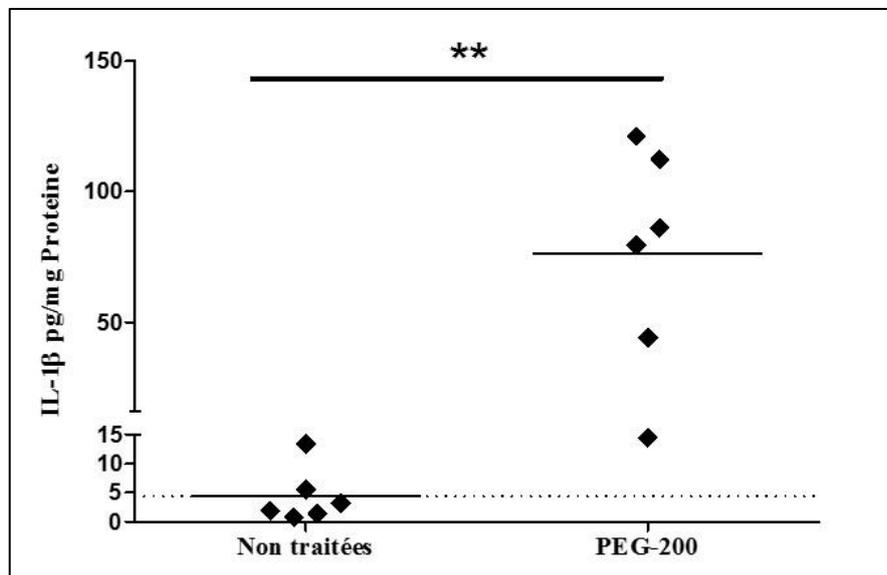


Figure 46 : Dosage de l'IL-1 β par ELISA dans l'hippocampe de souris sauvages

(mâles et femelles non différenciés)

Pour comparer les valeurs des deux groupes, le test de Mann-Whitney a été utilisé. ** $P < 0,005$.

Ainsi, le PEG 200, utilisé comme véhicule pour solubiliser les polyphénols, a une activité pro-inflammatoire au niveau de l'hippocampe des souris, lorsqu'il est administré par

injection par voie i.p. de façon hebdomadaire pendant 4 mois. Cette activité pro-inflammatoire se traduit par une augmentation du nombre et de la réactivité des cellules astrocytaires et microgliales, ainsi que de la sécrétion du facteur pro-inflammatoire IL-1 β .

L'ensemble de ces résultats est résumé dans la table 6.

Volet 1 (traitement de 7 à 11 mois, effet PEG 200)	
Paramètres étudiés	PEG 200
Activation astrocytaire	Intensité GFAP (IF)
	X 2,3 *
	Nombre de cellules GFAP positives (IF)
	X 2,5 *
	Expression GFAP (WB)
	X 4,3 *
Activation microgliale	Intensité IBA1 (IF)
	X 2,5 *
	Nombre de cellules IBA1 positives (IF)
	Apparition ~ 5 cellules par cm² *
Expression d'IL-1 β	Concentration IL-1 β (ELISA)
	+ 70 % **

Table 8 : Récapitulatif des effets pro-inflammatoires du PEG 200 administré de façon hebdomadaire à des souris sauvages par injection par voie i.p. entre 7 et 11 mois

* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$

L'ensemble de ces données a permis d'écrire un deuxième article de résultats expérimentaux s'intitulant : « *Chronic intraperitoneal injection of polyethylene glycol 200 in mice induces hippocampal neuroinflammation* ». Celui-ci a pour objectif d'informer la communauté scientifique sur les effets neuroinflammatoires du PEG 200, fréquemment utilisé comme véhicule dans des études animales, lorsqu'il est administré chroniquement par injection par voie i.p., risquant de biaiser les résultats de certaines études portant sur la neuroinflammation.

Article 2

Freyssin A, Fauconneau B, Chassaing D, Rioux Bilan A*, Page G* (*Co-last authors).

Chronic intraperitoneal injection of polyethylene glycol 200 in mice induces hippocampal neuroinflammation

Soumis dans « Drug and Chemical Toxicology », numéro de soumission : LDCT-2020-0408.



mc.manuscriptcentral.com/dct



**Chronic intraperitoneal injection of polyethylene glycol 200
in mice induces hippocampal neuroinflammation**

Journal:	<i>Drug and Chemical Toxicology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	FREYSSIN, Aline; University of Poitiers, FAUCONNEAU, Bernard; University of Poitiers CHASSAING, Damien; University of Poitiers RIOUX BILAN, Agnès; University of Poitiers PAGE, Guylène; University of Poitiers
Keywords:	PEG 200, Chronic i.p. administration, Neuroinflammation, Astrocytes, Microglia, IL-1 β

SCHOLARONE™
Manuscripts

Chronic intraperitoneal injection of polyethylene glycol 200 in mice induces hippocampal neuroinflammation

FREYSSIN Aline^{1#}, FAUCONNEAU Bernard¹, CHASSAING Damien¹, RIOUX BILAN Agnès^{1*}, PAGE Guylène^{1*}

[#]Corresponding author (aline.freyssin@univ-poitiers.fr ; ORCID: 0000-0002-8944-4243)

^{*}Co-last authors

¹University of Poitiers, EA3808 Neurovascular Unit and Cognitive Disorders, Pôle Biologie Santé, POITIERS, France

Abstract

In vivo treatment of hydrophobic substances requires the use of organic solvents, which are often toxic. Consequently, polyethylene glycols (PEGs), which are considered as non-toxic, have been largely used for many years in chemistry and biology. We used PEG 200, which was administrated by intraperitoneal (i.p.) injection once a week to mice. After 4 months of injections, at the dose of 1.67 mL/kg, a surprising increase in expression of GFAP (glial *fibrillary acidic protein*) and IBA1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1), glial markers of astrocytes and microglia respectively, was observed in the mice's hippocampus. These results were associated with a dramatical increase in pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) expression, all together suggesting an inflammatory process.

It is important to communicate these results to the scientific community in order to question the use of PEG 200 as a vehicle for many molecules *via* i.p. in various fundamental research studies.

Keywords: PEG 200, Chronic i.p. administration, Neuroinflammation, Astrocytes, Microglia, IL-1 β

Introduction

Polyethylene glycols (PEGs) are largely used in medical and biomedical fields. When attached to various protein medications, PEGs contribute to drugs protection by PEGylation or to link other substrates to specifically targeted tissue (Gao et al., 2016; Parnaud et al., 1999). Indeed, PEGs allow a slowed clearance of the carried protein from the blood and increase their duration of action, as well as reduce immunogenicity and prevent their capture by the reticuloendothelial system (Veronese Francesco 2002; Yemişçi *et al.* 2012). Several studies demonstrated a protective and a curative role of PEGs in medicine notably thanks to the ability of PEGs to cross the blood brain barrier (BBB) (McClung *et al.* 1990). Indeed, PEGs molecules protect against cold injury and ischemic damage (Bruinsma *et al.* 2015), induce a nerve repair *via* cell aggregation and membrane modification (Abdou & Henderson 2019), and could reduce beta-amyloid precursor protein accumulation in degenerating axons (Koob & Borgens 2006). PEGs are frequently used as vehicles in many drugs and for the last few years have replaced organic solvent due to their high solubility power. Low molecular weight PEGs are good solvents and are widely used for a variety of reasons: viscosity controlling, solubility, moisturizing. They are generally considered non-toxic when applied orally or dermally (Rowe 2009; Smyth *et al.* 1955). The different types of PEGs differ, according to their average molecular weight from which they are named.

Among these PEGs, PEG 200 has the lowest molecular weight and is used as a solvent with or without the addition of water. It has the capacity to dissolve organic molecules but also inorganic salts by complexation. In 1965, LD₅₀ of PEG 200 was determined at 7.5 mL/kg when administered intraperitoneally to mice (Worthley and Schott, 1965). Taking into account these last properties of PEG 200, many studies used it as a solvent to test an insoluble molecule in 0.9% sodium chloride (NaCl). Although PEG 200 is currently considered as almost non-toxic, researchers noticed some adverse events of PEGs. First of all, a toxicity characterized by oxalate crystals in the renal cortex was observed in monkeys and rats orally treated daily by PEG 200 at the doses of 2 to 4 mL/kg

and 2.5 to 5.0 mL/kg respectively for 13 weeks (Prentice & Majeed 1978). Then, the previous toxicity of PEG 200 but also pain were observed at the dose of 8 mL/kg by i.p. injection in mice (Thiele et al., 2019). Moreover, PEG-linked proteins have the ability to induce renal tubular vacuolation in Sprague–Dawley rats injected at 20–40 mg/kg by intravenous route (Bendele *et al.* 1998).

In a study, we used PEG 200 as a vehicle to dissolve a non-dissociable molecule in 0.9% NaCl. PEG 200 was injected in B6C3F1 mice at the approved dose of 1.67 mL/kg. This group of mice corresponded to the control group in the study aiming to demonstrate the efficacy of various molecules of interest. Unexpectedly, after 4 months of weekly i.p. injections, PEG 200 induced neuroinflammation in the mice's hippocampus.

Materials and methods

Chemical products

PEG 200, paraformaldehyde, dithiothreitol (DTT) and all chemical products for buffers were purchased from Sigma-Aldrich of Merck group (St Quentin Fallavier, France). Antibodies used in experiments were purchased from Sigma Aldrich of Merck group (St Quentin Fallavier, France), Abcam (France), Cell signaling (Ozyme distributor, Saint-Cyr-l'École, France) and Jackson immunoresearch Europe Ltd (Interchim distributor, Montluçon, France). Dilutions of antibodies are indicated in **table 1**. The IL-1 β ELISA kit was purchased from BioLegend (Ozyme distributor, Saint-Cyr-l'École, France).

Animals and treatment

In the laboratory, we have APP^{swe}PS1^{dE9} transgenic mice (from Mutant Mouse Resources and Research Centers, Stock No: 34829-JAX) displaying Alzheimer phenotype (Authorization from “Haut Comité de Biotechnologie français” (HCB) to Pr Guylène PAGE, number 2040 for reproduction, treatment, behavioral tests and *ex-vivo* experiments). This study was included in a

research project with APP^{swe}PS1^{dE9} transgenic mice. Thus, wild-type (WT) mice with B6C3F1 background were obtained by crossing a male APP^{swe}PS1^{dE9} mouse with a WT female mouse (from Charles River, strain Code 031). In this study, the WT mice came from several breeding pairs. The use of animals was approved by the Ethical and Animal Care Committee (N°84 COMETHEA (Ethical Committee for Animal Experimentation) Poitou-Charentes, France) and by the French ministry (agreement number: 2015072717461531 to Pr Guylène PAGE as designer of experimental projects on animals for scientific purposes). All animals care and experimental procedures conformed with the French Decret number 2013–118, 1 February 2013 NOR: AGRG1231951D in accordance to European Community guidelines (directive 2010/63/UE). All efforts were made to minimize animal suffering, as well as the number of animals used. The animals were housed in a conventional state under adequate temperature ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$) and relative humidity ($55 \pm 5\%$) control with a 12/12 h reversed light/dark with access to food and water *ad libitum*. During all the study, the general state health of the mice was evaluated weekly by monitoring their body weight, food and water intake.

For this study, 12 mice (males and females) were used. Six mice were treated weekly from 7 to 11 months by i.p. injection of PEG 200 (diluted in 0.9% NaCl extemporaneously) at the dose of 1.67 mL/kg, whereas the others six were not treated. The dose of PEG 200 and administration period were defined in the research project in progress with APP^{swe}PS1^{dE9} mice using PEG 200 as vehicle of treatments. After last treatment, mice were transcardially perfused with cold PBS followed by paraformaldehyde (PFA) 4% after deep anesthesia with a mix of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Brains were rapidly removed, and the right hemisphere was immediately placed in 4% PFA overnight at 4°C for immunofluorescence studies. In the left hemisphere, the hippocampus was dissected and homogenized for biochemical experiments. All samples were stored at -80°C until further experiments.

Immunofluorescence

After 24 h in 4% PFA at 4°C, the right brain hemispheres of 6 treated and 3 untreated mice were rinsed in PBS (*Phosphate* buffered saline), dehydrated, and embedded in paraffin for sagittal sectioning (4 µm thickness). Sagittal sections were cut in a microtome (Microm HM335E) and mounted on Super-Frost Plus1 slides (CML, Nemours, France) with water and conserved at 4°C until their utilization. Immunolabellings were performed as previously described (Couturier *et al.* 2012; Damjanac *et al.* 2007), using specific antibodies at the dilutions indicated in the **table 1**. Multiple labelled samples (2 slices *per* mice) were examined with Olympus BX51 epifluorescent optical microscope. Images were blind analyzed with ImageJ. For quantification GFAP or IBA-1 signals, all densities indicated by « raw integrated density » were compiled in Graph Pad Prism for statistical analysis. Positive cells number / mm² was counted randomly in 4 squares (4 cm²) in independent areas of image.

Biochemical experiments

After euthanasia, hippocampus of the left hemisphere was dissected and homogenized for biochemical experiments as previously described (François *et al.*, 2014) in 10 volumes of lysis buffer (25 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) and supplemented with 50 mM NaF, 1 mM PMSF, protease and phosphatase inhibitor cocktails (50 µL/g of tissue and 10 µL/mL of lysis buffer, respectively). Before use, supernatants for western-blots and ELISA were stored at -80°C.

Western blot

For each sample, 10 µg proteins were denatured in Laemmli Sample Buffer containing 0.05 mM DDT by boiling during 5 min. Electrophoreses in 4-20% Tris-Glycine gels were performed according to the manufacturer recommendations (at 150 V during 40 min in Tris-Glycine SDS Running Buffer). Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes using the Trans-Blot Turbo system set to program 25 V for 7 min. Membranes were washed for 10 min in Tris-buffered

saline/Tween (TBST: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.05% Tween 20) and non-specific antigenic sites were blocked 2 h in TBST containing 5% semi-skimmed milk. Membranes were incubated with primary antibody at the adequate dilution (**table 1**) overnight at 4°C. Then, they were washed twice with TBST and incubated with the HRP (horseradish peroxidase)-conjugated secondary antibody (**table 1**) during 1h at room temperature (RT). Membranes were washed again and exposed to the chemiluminescence Luminata Forte Substrate (Millipore, Saint-Quentin Fallavier, France). After two washes in TBST, membranes were incubated with mouse antibody against β -actin overnight at 4°C, washed with TBST and incubated with HRP-conjugated secondary antibody for 1h before to be exposed to the chemiluminescence Luminata Classico Substrate (Millipore, Saint-Quentin Fallavier, France). All luminescent signals were captured by the Gbox system (GeneSnap software, Syngene, Ozyme distributor, France). Automatic image analysis software was supplied with Gene Tools (Syngene, Ozyme distributor, France). In each case, interest protein / β -actin *ratios* were calculated, and results were normalized with the average of the untreated group.

ELISA

IL-1 β ELISA was performed using commercially available ELISA kit (sensitivity: 16 pg/mL) according to the manufacturers' instructions (BioLegend, France). The range of analysis was between 16 to 1000 pg/mL. Homogenates from brain tissue (100 μ L at the concentration of 100 mg of tissue/mL) were added in each well of pre-coated plates and all steps were performed at RT. The enzymatic reaction was stopped after 15 minutes incubation with tetramethylbenzidine substrate by adding 2 N H₂SO₄ and the optical density (OD) was read at 450 nm within 30 min, using the Multiskan® spectrum spectrophotometer (ThermoScientific, Villebon sur Yvette, France). The cytokine level was then calculated by plotting the OD of each sample compared to the standard curve. For convenience, all results were expressed in pg/mg protein.

Statistical analysis

Results were expressed as average \pm standard error (SEM). Statistical program Graph-Pad (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used to compare quantitative variables. For all comparisons, the level of significance was $p < 0.05$. To compare quantitative variables between two groups, the Mann-Whitney test was used.

Results

PEG 200 increases GFAP immunoreactivity

To visualize hippocampal astrocytes of treated and untreated mice, immunofluorescence on brain sections was performed using antibody against GFAP, the main constituent of astrocyte intermediate filaments (figure 1 near there). We observed visual differences between both groups (**Fig. 1**). Indeed, in the hippocampus of untreated mice (**Fig 1, panels A and A'**), weak signal was observed whereas astrocytes of PEG 200-treated mice exhibited intense GFAP immunoreactivity (**Fig 1, panels B and B'**). Quantification of GFAP intensity (**Fig 1, panel C**) showed an increase by 2.3 times *vs* untreated mice ($p < 0.05$). Moreover, the number of astrocytes (**Fig 1, panel D**) is significantly higher (2.5 times) in the hippocampus of PEG 200 treated mice than untreated mice ($p < 0.05$).

Hippocampal GFAP expressions in both groups were also quantified by western blot (**Fig 2, panel A**). GFAP expression (**Fig. 2 panel B**) in the hippocampus of PEG 200 treated mice was significantly (4.7 times) more expressed than in untreated mice ($p < 0.005$). (figure 2 near there).

PEG 200 increases IBA1 immunoreactivity

Immunofluorescence was also applied on brain sections of both mouse groups to observe IBA1 expression, a protein that is currently used to show microglia (**Fig. 3**). (figure 3 near there).

Some microglial cells were observed in the hippocampus of PEG 200-treated mice (**Fig. 3 panels B and B'**) whereas only a background signal was detected in control mice (**Fig. 3 panels A and A'**). Quantification of IBA1 signal (**Fig. 3 panels C**) showed a significant 12 times increase ($p < 0.05$). This increase can be ascribed to the presence of positive cells in the hippocampus of PEG 200-treated mice (50 cells /mm²), whereas no microglial cells were observed in untreated mice ($p < 0.05$, **Fig. 3 panel D**).

PEG 200 increases IL-1 β production

Cytokines secreted by activated astrocytes and microglia, but also by neurons, are crucial in the inflammatory response. The level of IL-1 β in mice was key to investigate the effect of PEG 200 on this cytokine expression (figure 4 near there). The levels of IL-1 β were dramatically increased by 70% ($p < 0.005$, **Fig 4**) in the hippocampus of PEG 200-treated mice vs untreated mice.

Discussion

PEG 200 is largely used in numerous studies to prepare substances poorly soluble in aqueous solutions. Furthermore, it is important to minimize the suffering of animals during the experiments. Among vehicles, PEG 200 was considered harmless compared to dimethylsulfoxide (DMSO) (Santos *et al.* 2003). In 1965, LD₅₀ (lethal dose 50%) of PEG 200 was determined at 7.5 mL/kg when i.p. administrated in swiss mice (Worthley and Schott, 1965). Moreover, a toxic dose of 8 mL/kg of PEG 200 also caused pain in mice (Thiele *et al.* 2019). We have used PEG 200 as a vehicle for *in vivo* studies on B6C3F1 mice. We have injected weekly PEG 200 i.p. at the dose of 1.67 mL/kg during 4 months to mice. Unexpectedly, in these treated mice, an increase of astrocytes and microglia associated to overexpression of GFAP and IBA1 was observed in the hippocampus. These results were associated with a dramatical increase of pro-inflammatory cytokine IL-1 β expression, all together suggesting an inflammatory process.

Similar neuroinflammation has been previously described but with other administration routes, such as cerebral injection (Kornev *et al.* 2018). *In vitro*, in 2D and 3D cultures of neural precursor cells, PEG macromere was used and increased glial cells reactivity (Lampe *et al.* 2010). *In vivo*, an injection of a PEG nanocomposite gel into the rat striatum induced a significant increase in inflammatory and astroglial responses after 30 days in the hemisphere that received the injection (Tamariz *et al.*, 2011). The overexpression of glial cells and IL-1 β are the sign of damage found in chronic diseases and tissue injury (Mendiola & Cardona 2018). Indeed, activated glial cells release a wide variety of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , which contributes to cellular defense and tissue repair in nearly all tissues (Dinarello 1996). No publication has described an increase in neuroinflammation following an i.p. injection. Moreover, it has been shown that i.p. injection of saline solution did not increase the number of GFAP and IBA1- positive cells, nor IL-1 β release (Lundgaard *et al.* 2018; Wang *et al.* 2016). It is known that PEG 200 crossed the BBB (McClung *et al.* 1990). Obviously, in our study, PEG 200 is responsible of hippocampal neuroinflammation. To our knowledge, this adverse event has never been described, and observed following chronic peripheral administration of PEG 200.

Even if i.p. injections of PEG 200 were well tolerated by mice and no pain was observed, a significant increase of neuroinflammation markers was detected in the mice's hippocampus. It is important to communicate these results to the scientific community in order to question the use of PEG 200 as a vehicle for many molecules *via* i.p. in various fundamental research studies.

Acknowledgements

This work has benefited from the facilities and expertise of PREBIOS platform (University of Poitiers, France). This research did not receive any specific grant from funding agencies in the commercial or non-profit sectors. This study benefited from the university endowment allocated

to the EA3808 laboratory and from “Agence Nationale de la Recherche” fundings (ANR-17-CE07-0030-01, G. Page as partner). We thank Justine Cebe for language editing.

Disclosure of interest

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- Abdou, S. A., & Henderson, P. W. (2019). Fusogens: Chemical Agents That Can Rapidly Restore Function After Nerve Injury. *Journal of Surgical Research*, **233**, 36–40.
- Bendele, A., Seely, J., Richey, C., Sennello, G., & Shopp, G. (1998). Short communication: renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, **42**(2), 152–157.
- Bruinsma, B. G., Berendsen, T. A., Izamis, M.-L., Yeh, H., Yarmush, M. L., & Uygun, K. (2015). Supercooling preservation and transplantation of the rat liver. *Nature Protocols*, **10**(3), 484–494.
- Dinarelo, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, **87**(6), 2095–2147.
- Koob, A. O., & Borgens, R. B. (2006). Polyethylene glycol treatment after traumatic brain injury reduces β -amyloid precursor protein accumulation in degenerating axons. *Journal of Neuroscience Research*, **83**(8), 1558–1563.
- Kornev, V. A., Grebenik, E. A., Solovieva, A. B., Dmitriev, R. I., & Timashev, P. S. (2018). Hydrogel-assisted neuroregeneration approaches towards brain injury therapy: A state-of-the-art review. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **16**, 488–502.
- Lundgaard, I., Wang, W., Eberhardt, A., ... Nedergaard, M. (2018). Beneficial effects of low alcohol exposure, but adverse effects of high alcohol intake on glymphatic function. *Scientific Reports*, **8**(1), 2246.
- McClung, H. J., Sloan, H. R., Powers, P., ... Pollack, J. D. (1990). Early changes in the permeability of the blood-brain barrier produced by toxins associated with liver failure. *Pediatric Research*, **28**(3), 227–231.
- Mendiola, A. S., & Cardona, A. E. (2018). The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, **125**(5), 781–795.
- Parnaud, G., Taché, S., Peiffer, G., & Corpet, D. E. (1999). Polyethylene-glycol suppresses colon cancer and causes dose-dependent regression of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats. *Cancer Research*, **59**(20), 5143–5147.
- Prentice, D. E., & Majeed, S. K. (1978). Oral toxicity of polyethylene glycol (PEG 200) in monkeys and rats. *Toxicology Letters*, **2**(2), 119–122.

- Rowe, R. C. (Ed.). (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients*, 6. ed, London: APhA, (PhP) Pharmaceutical Press.
- Santos, N. C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., & Saldanha, C. (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*, **65**(7), 1035–1041.
- Smyth, H. F., Carpenter, C. P., & Weil, C. S. (1955). The Chronic Oral Toxicology of the Polyethylene Glycols*. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific Ed.)*, **44**(1), 27–30.
- Tamariz, E., Wan, A. C. A., Pek, Y. S., ... Castaño, V. M. (2011). Delivery of chemotropic proteins and improvement of dopaminergic neuron outgrowth through a thixotropic hybrid nano-gel. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **22**(9), 2097–2109.
- Thiele, W., Kyjacova, L., Köhler, A., & Sleeman, J. P. (2019). A cautionary note: Toxicity of polyethylene glycol 200 injected intraperitoneally into mice. *Laboratory Animals*, 002367721987368.
- Veronese Francesco. (2002). Introduction and overview of peptide and protein pegylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**(4), 453–456.
- Wang, L.-L., Shi, D.-L., Gu, H.-Y., ... Chen, Y.-Y. (2016). Resveratrol attenuates inflammatory hyperalgesia by inhibiting glial activation in mice spinal cords. *Molecular Medicine Reports*, **13**(5), 4051–4057.
- Worthley, E. G., & Schott, C. D. (1965). Pharmacotoxic evaluation of nine vehicles administered intraperitoneally to mice.; Fort Belvoir, VA: Defense Technical Information Center. Retrieved from <http://www.dtic.mil/docs/citations/AD0628313>
- Yemişçi, M., Gürsoy-Özdemir, Y., Caban, S., Bodur, E., Capan, Y., & Dalkara, T. (2012). Transport of a caspase inhibitor across the blood-brain barrier by chitosan nanoparticles. *Methods in Enzymology*, **508**, 253–269.

Figure 1

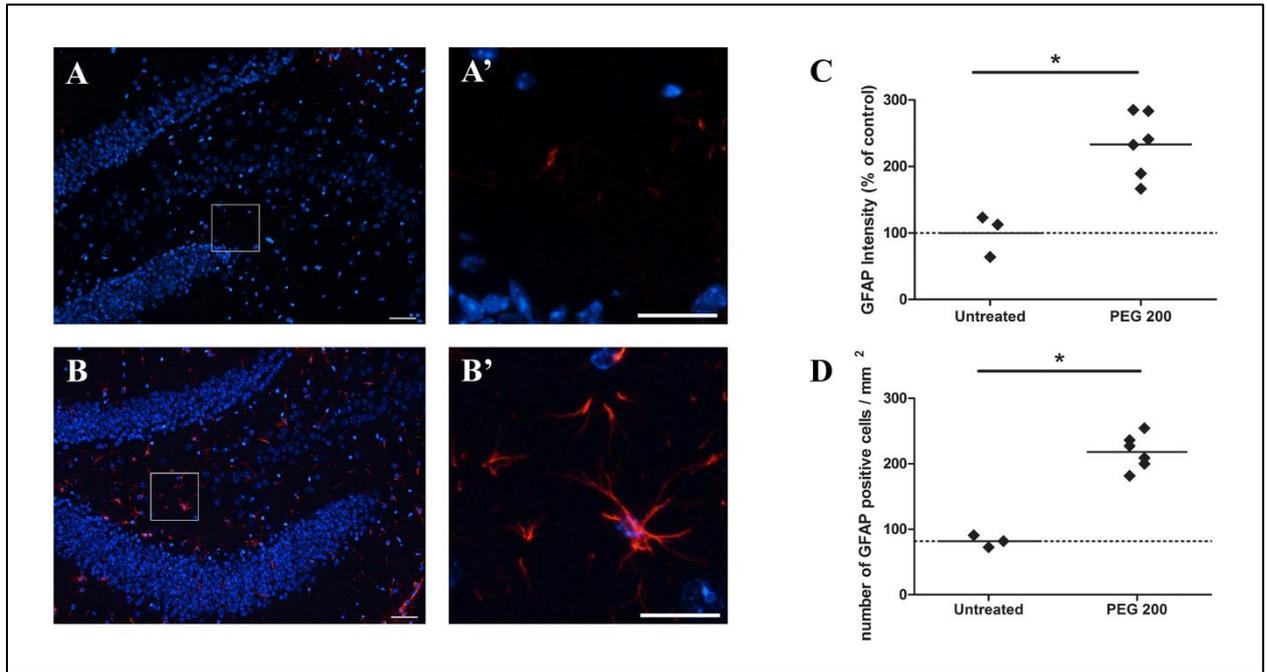


Figure 2

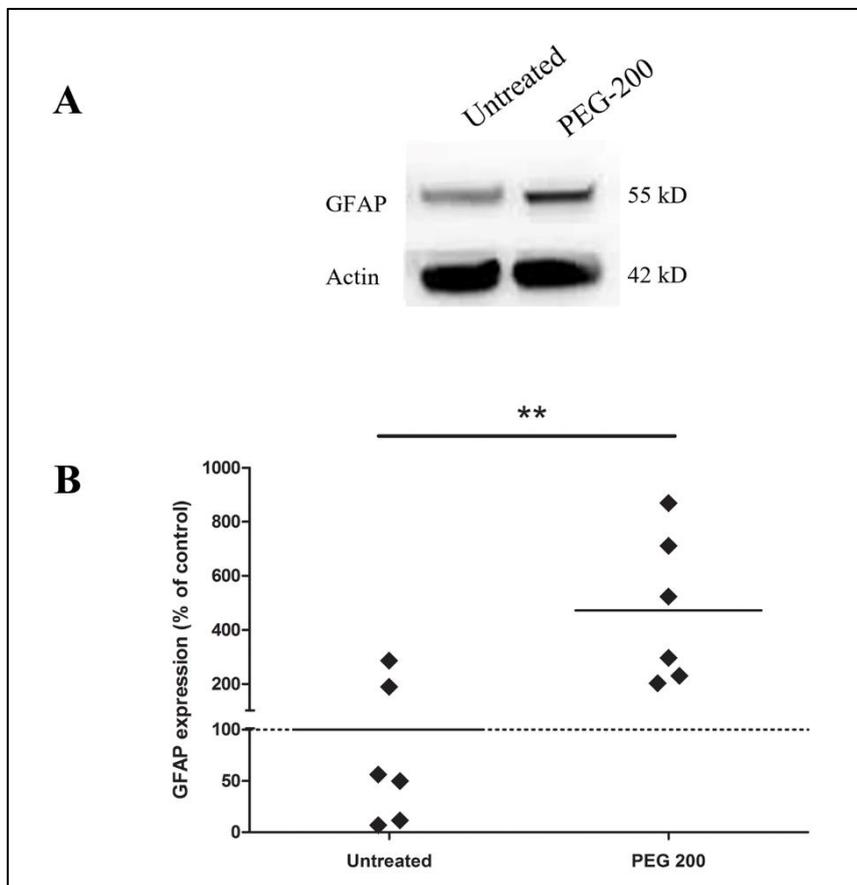


Figure 3

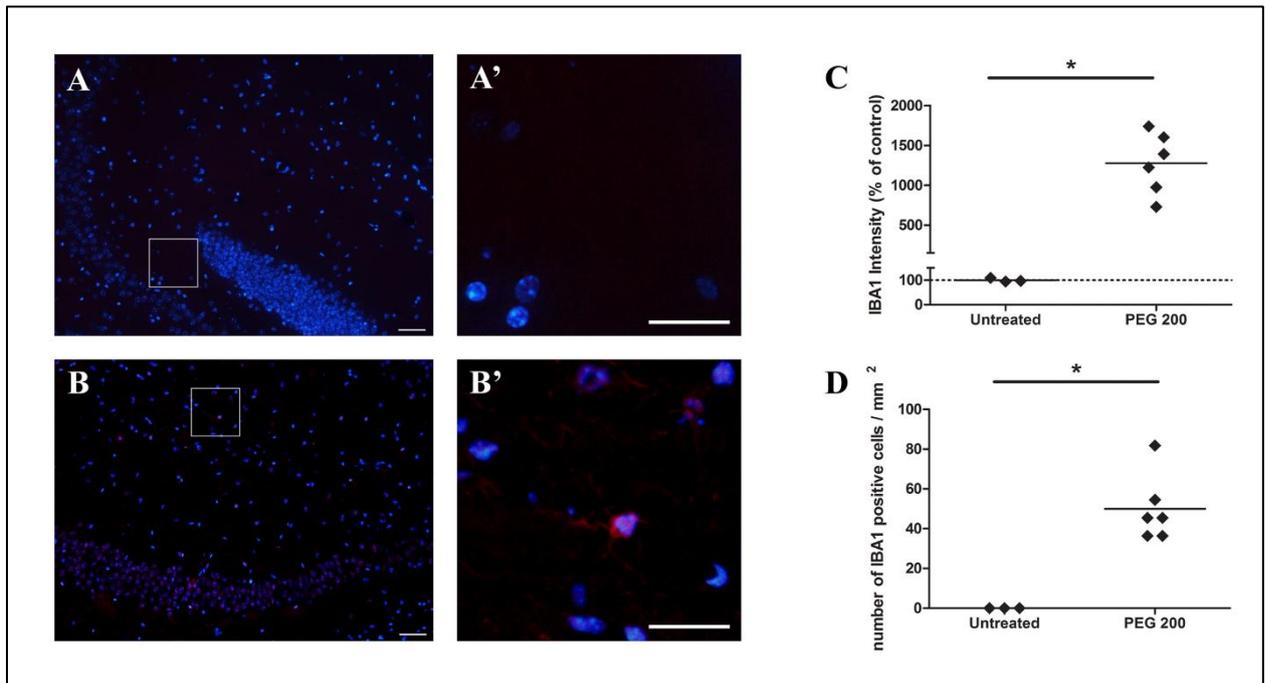
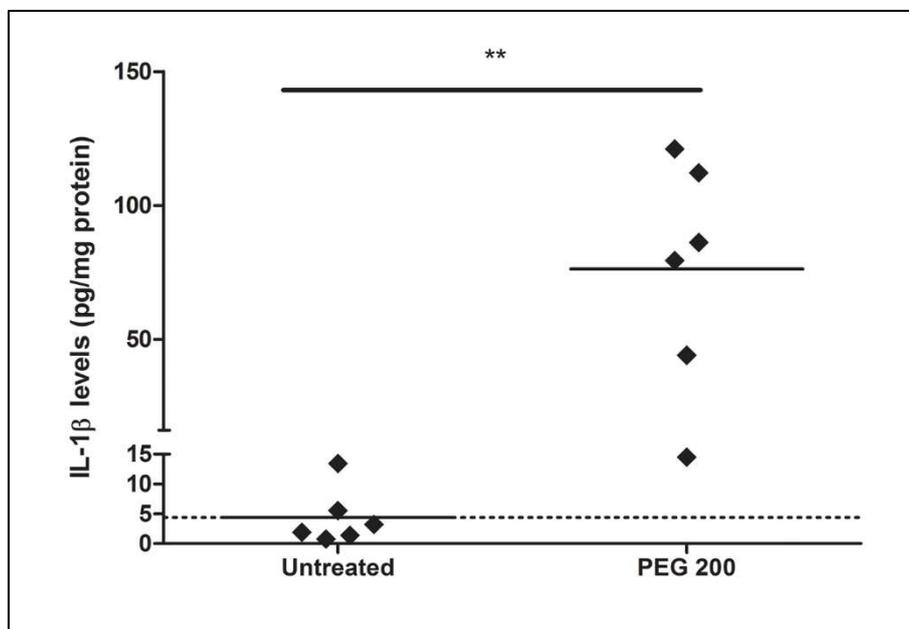


Figure 4



Graphical abstract

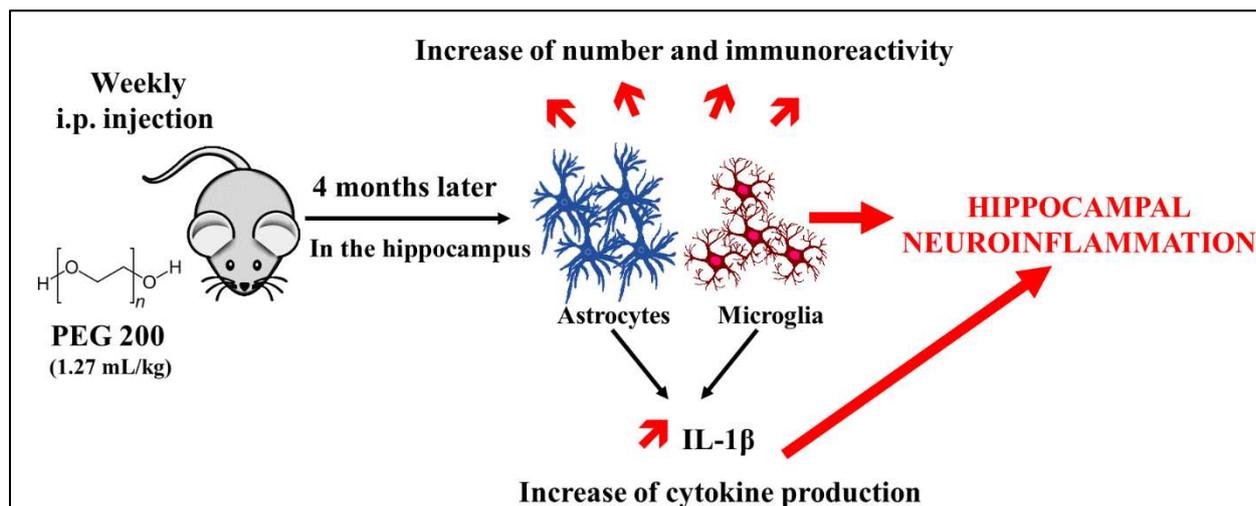


Figure captions

Figure 1: PEG 200 increases number and immunoreactivity of astrocytes in the hippocampus

Astrocytes were stained with antibody against GFAP (red) and nuclei with DAPI (blue), in panels A for untreated mice and B for PEG 200-treated mice. On each image, A' and B', a magnification (X20) and a zoom (X3) was done. Signal intensity of GFAP and number of GFAP positive cells were represented in panels C and D respectively. The dotted line represents the mean of untreated mice. To compare values between both groups, Mann-Whitney test was used. Scale bars: 50 μm . * $P < 0.05$.

Figure 2: PEG 200 increases hippocampal expression of GFAP

GFAP and actin signals were visualized by western-blot in panel A. GFAP / β -actin ratios were calculated and shown in panel B. The dotted line represents the mean of untreated mice and PEG 200-treated mice are expressed as percentage of control. To compare values between both groups, Mann-Whitney test was used. ** $P < 0.005$.

Figure 3: PEG 200 increases the number of microglia in the hippocampus

Microglia were stained with antibody against IBA1 (red) and nuclei with DAPI (blue), in panels A for untreated mice and B for PEG 200-treated mice. On each image, A' and B', a magnification (X20) and a zoom (X3) was done. Signal intensity of IBA1 and number of IBA1 positive cells were represented in panels C and D respectively. The dotted line represents the mean of untreated mice. To compare values between both groups, Mann-Whitney test was used. Scale bars: 50 μ m. *P<0.05.

Figure 4: PEG 200 increases IL-1 β expression in the hippocampus

IL-1 β ELISA was performed on hippocampal homogenates. The dotted line represents the mean of untreated mice. To compare values between both groups, Mann-Whitney test was used. **P<0.005.

Table 1: Details of sources and dilutions of primary and secondary antibodies used in the study

Antibodies	Dilution for WB	Dilution for IF	Source
<i>Primary antibodies</i>			
Rabbit anti-GFAP	1:1000	1:1000	Ozyme
Goat anti-IBA-1	/	1:50	Abcam
Mouse anti-Actin	1:1000	/	Sigma Aldrich
<i>Secondary antibodies</i>			
Donkey anti-rabbit-RRX	/	1:50	Jackson immunoresearch
Donkey anti-goat-RRX	/	1:50	Jackson immunoresearch
Goat anti-rabbit IgG-HRP	1:1000	/	Ozyme
Horse anti-mouse IgG-HRP	1:1000	/	Ozyme

2 Volet 2

Comparaison des effets du resvératrol et de la viniférine administrés entre 3 et 12 mois

Une dose hebdomadaire de viniférine (20 mg/kg), de resvératrol (20 mg/kg) ou du même volume de véhicule (PEG 200 1,67 mL/kg dilué dans NaCl 0,9 %) a été injectée par voie i.p. de 3 mois à 12 mois aux souris APPswePS1dE9 et aux souris sauvages de même fond génétique. Cette étude a été réalisée dans le but de comparer la capacité du resvératrol et de la viniférine à prévenir ou ralentir l'évolution de la maladie. En effet, le traitement a débuté dès 3 mois, âge auquel les dépôts amyloïdes et la neuroinflammation ne sont pas encore présents dans le cerveau des souris APPswePS1dE9 et a été stoppé à 12 mois, âge auquel ces plaques amyloïdes et la neuroinflammation sont abondants et développés dans le cerveau de ces souris Alzheimer.

Dans ce deuxième volet, 120 souris ont été traitées, 60 sauvages et 60 APPswePS1dE9, ces deux groupes comportant autant de mâles que de femelles. Mais certains paramètres n'ont pas pu être analysés pour toutes les souris par manque de temps dû à la crise sanitaire liée au coronavirus. L'analyse des capacités mnésiques et du déclin cognitif a été effectuée sur l'ensemble des souris sauvages et APPswePS1dE9. En revanche, l'analyse des dépôts amyloïdes a concerné 39 souris APPswePS1dE9 sur les 60 traitées et celle des marqueurs inflammatoires uniquement quelques souris APPswePS1dE9 et sauvages, dans le but de confirmer l'effet pro-inflammatoire du PEG 200.

L'analyse des plaques amyloïdes par immunomarquage avec l'anticorps W02 montre un effet significatif de la viniférine sur l'intensité globale du marquage amyloïde (- 35 %, $P < 0,005$, **figure 47 panel A**) ainsi que sur le marquage ciblant plus spécifiquement les plaques amyloïdes (- 42 %, $P < 0,005$, **figure 47 panel B**). Cette diminution est néanmoins moins importante que celle observée lorsque le traitement a été administré de 7 à 11 mois (qui était d'environ - 80 %).

Toutes les quantifications des marquages par IF ont été effectuées grâce au logiciel Image J. Celle ciblant plus spécifiquement les plaques amyloïdes a été réalisée comme précédemment décrit (Caillaud et al., 2019). Ainsi, seules les particules ayant une taille supérieure à 100 pixels² ont été analysées et toutes les particules correspondant à un marquage intracellulaire ont été exclues. Les densités (Raw Integrated Densities évaluées par le logiciel Image J) des particules retenues ont été additionnées avant analyse statistique.

Dans ce graphique, de même que les suivants, les mâles sont représentés par des triangles bleus et les femelles par des ronds roses.

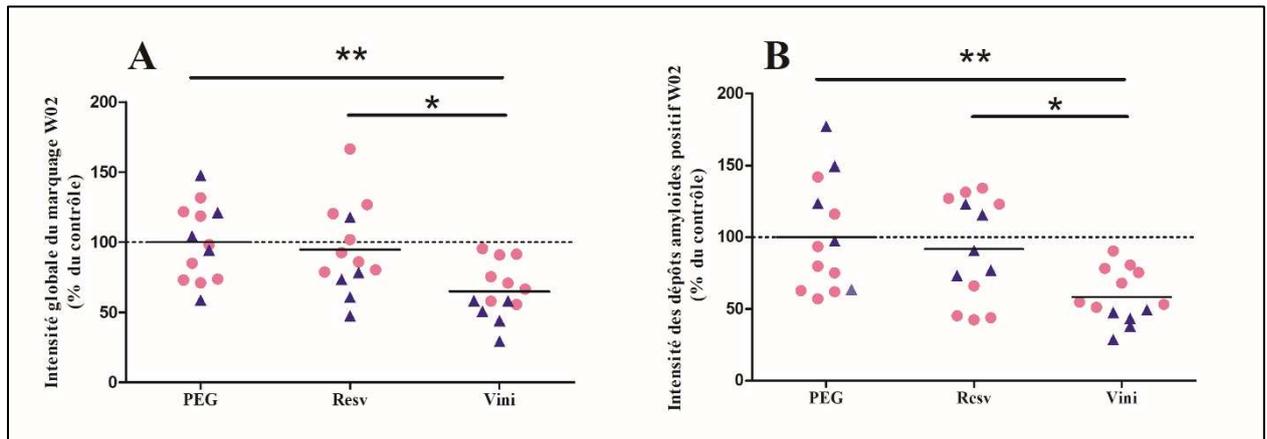


Figure 47 : Evaluation des dépôts amyloïdes par IF dans l'hippocampe des souris APPswePS1dE9

A : intensité du marquage amyloïde global (% du contrôle PEG)

B : intensité des plaques amyloïdes (% du contrôle PEG)

Pour comparer les valeurs des groupes 2 à 2, le test de Mann-Whitney a été utilisé. * $P < 0,05$ ** $P < 0,005$

Si on sépare mâles et femelles, on peut constater que, malgré un effectif réduit, les mâles APPswePS1dE9 traités par la viniférine présentent une diminution significative de 66 % ($P < 0,005$) de l'intensité (taille et densité) des dépôts amyloïdes dans l'hippocampe par rapport aux souris traitées par le PEG 200, ce qui n'est pas le cas chez les femelles (**figures 48 et 49**).

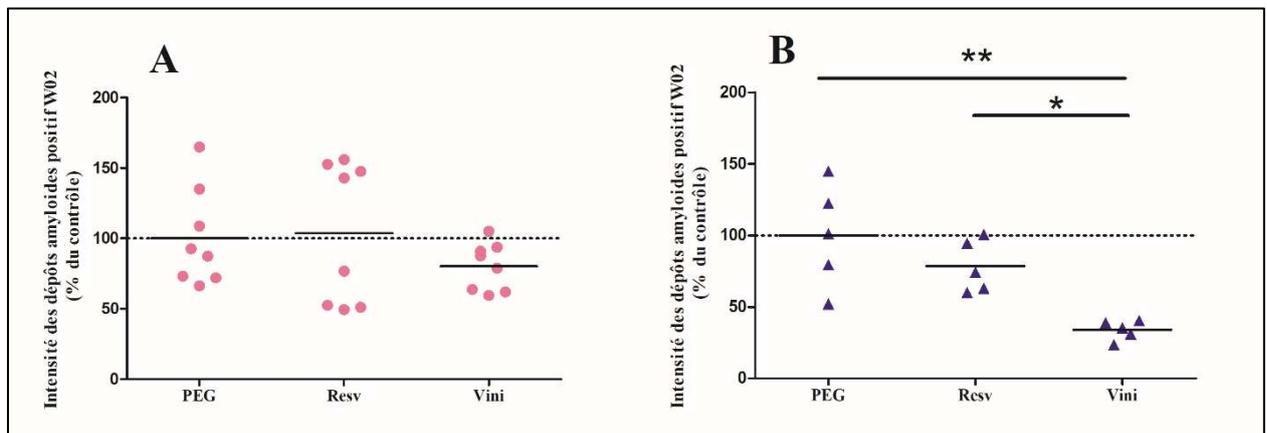


Figure 48 : Evaluation des dépôts amyloïdes par IF dans l'hippocampe des souris APPswePS1dE9 mâles et femelles

A : intensité des plaques amyloïdes chez les femelles (% du contrôle PEG)

B : intensité des plaques amyloïdes chez les mâles (% du contrôle PEG)

Pour comparer les valeurs des groupes 2 à 2, le test de Mann-Whitney a été utilisé.

* $P < 0,05$ ** $P < 0,005$

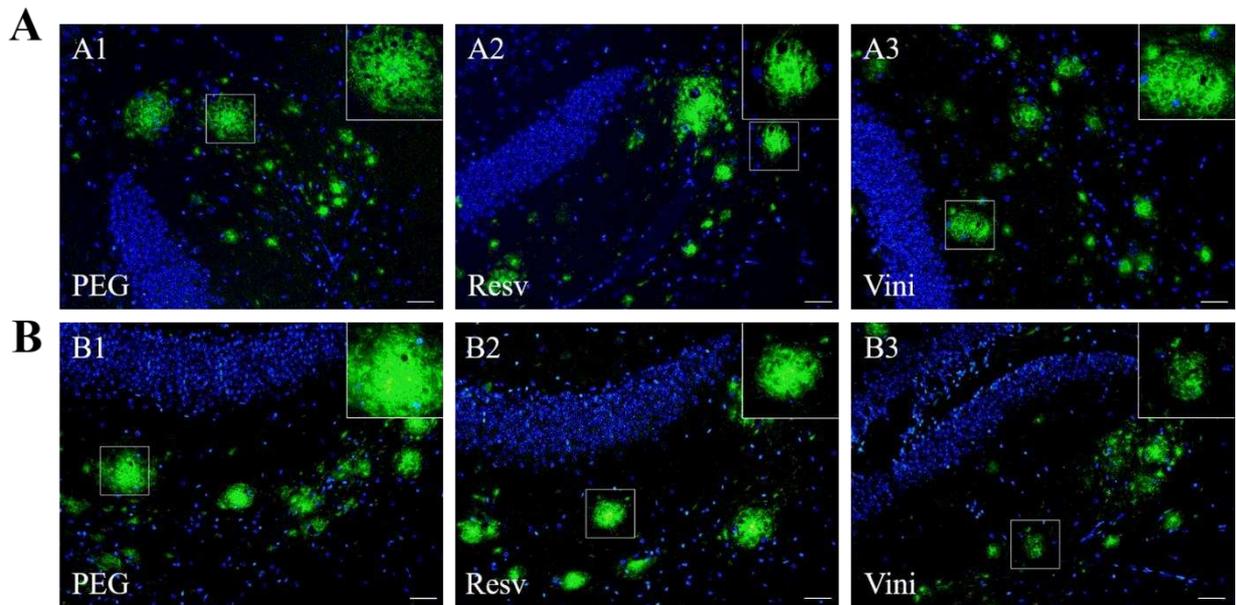


Figure 49 : Marquage par immunofluorescence des dépôts amyloïdes dans l'hippocampe des souris APPswePS1dE9

Les plaques amyloïdes ont été marquées en vert grâce à l'anticorps W02 dirigé contre le peptide amyloïde et les noyaux en bleu par le DAPI

A : souris APPswePS1dE9 femelles traitées par le PEG 200 (A1), le resvératrol (A2) ou la viniférine (A3)

B : souris APPswePS1dE9 mâles traitées par le PEG 200 (B1), le resvératrol (B2) ou la viniférine (B3)

Sur chaque image un zoom X20 a été réalisé. Echelle : 50 μ m

L'analyse du statut mnésique des souris APPswePS1dE9 ne montre aucun effet de la viniférine et du resvératrol sur le temps de rétention mesuré à 12 mois. En revanche, le temps de rétention demeure significativement différent entre les souris sauvages et APPswePS1dE9, quel que soit leur traitement (**figure 50**). Ce résultat significativement différent entre les souris sauvages et APPswePS1dE9 ayant reçu le véhicule ($P < 0,001$) représente donc bien les données de la littérature, avec un déficit mnésique décrit à 12 mois chez les souris APPswePS1dE9.

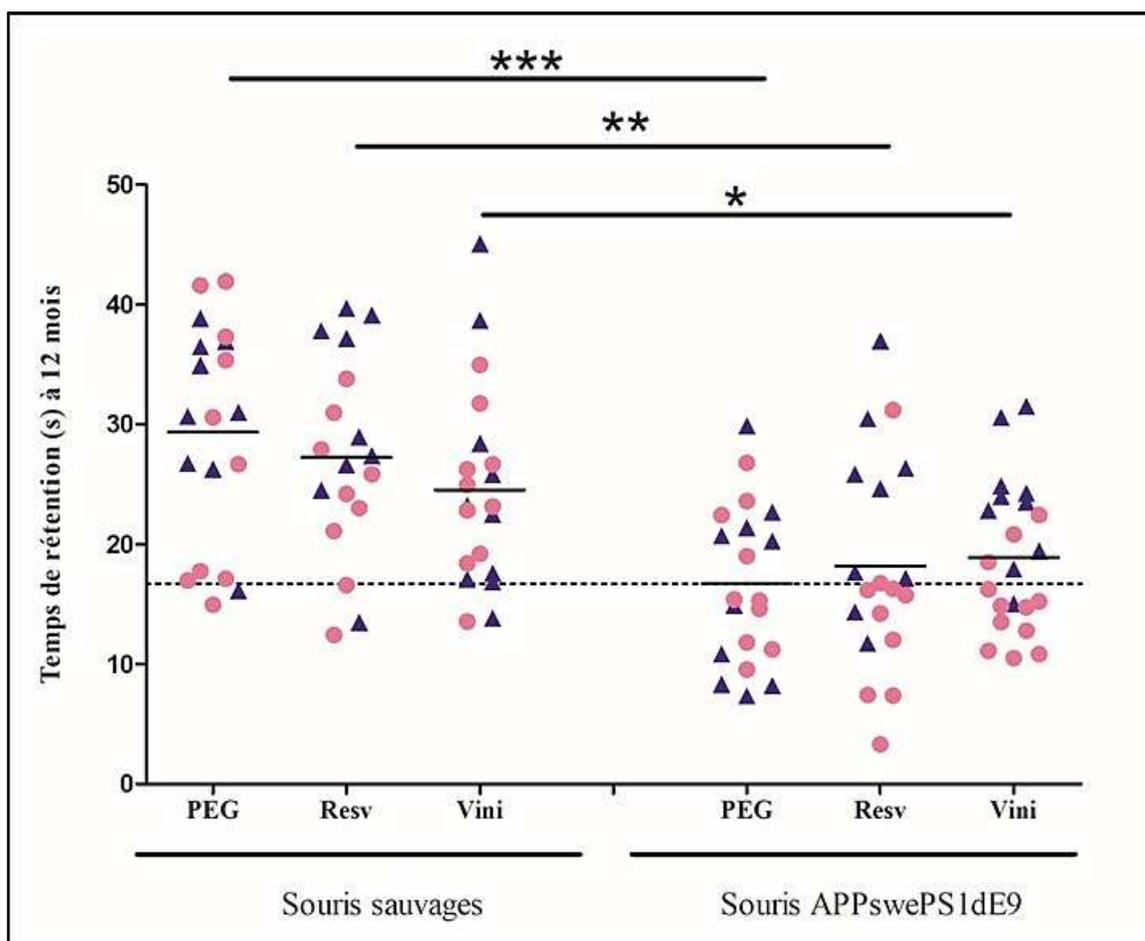


Figure 50 : Temps de rétention des souris sauvages et APPswePS1dE9 à 12 mois

Pour comparer les valeurs des groupes 2 à 2, le test de Mann-Whitney a été utilisé.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,001$

La variation individuelle du temps de rétention entre 3 et 12 mois (permettant de s'affranchir de la variabilité interindividuelle) des souris sauvages et APPswePS1dE9 est difficile à interpréter (**figure 51**) et ne permet pas de conclure quant à un effet bénéfique des polyphénols sur le déclin mnésique des souris APPswePS1dE9. L'analyse statistique des groupes 2 à 2 par le test de Mann-Whitney permet de mettre en évidence deux différences significatives. Ainsi, les souris sauvages traitées par le PEG 200 ont une variation individuelle du temps de rétention significativement supérieure à celle des souris APPswePS1dE9 traitées par le PEG 200 ($P < 0,005$). Les souris sauvages traitées par le resvératrol ont également une variation individuelle du temps de rétention significativement supérieure à celle des souris APPswePS1dE9 ayant reçu le même traitement ($P < 0,05$). Cependant, aucune différence significative n'est observée entre les souris sauvages traitées par la viniférine et les souris APPswePS1dE9 ayant reçu la viniférine également. On peut par ailleurs constater qu'il demeure une grande variabilité dans les 6 groupes.

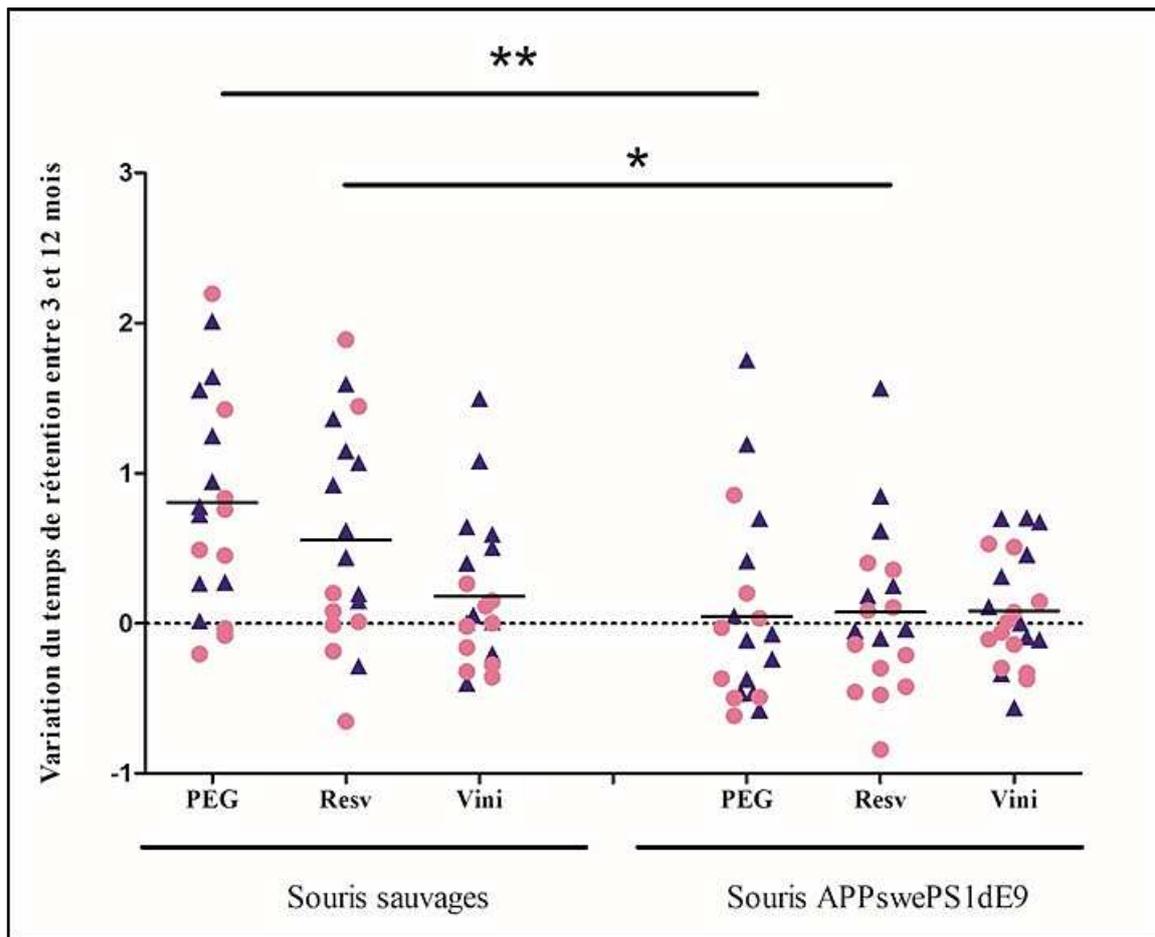


Figure 51 : Variation individuelle du temps de rétention entre 3 et 12 mois des souris sauvages et APPswePS1dE9

Pour comparer les valeurs des groupes 2 à 2, le test de Mann-Whitney a été utilisé.

** $P < 0,05$; ** $P < 0,005$*

L'analyse de la neuroinflammation par IF par immunomarquage avec des anticorps dirigés contre GFAP et IBA1 n'a montré aucune différence entre les souris sauvages et APPswePS1dE9 (**figures 52 et 53**). Ce résultat est cohérent avec celui mis en évidence dans le volet 1 (absence d'effet anti-inflammatoire des polyphénols injectés entre 7 et 11 mois). Une hypothèse est que l'éventuel effet anti-inflammatoire des polyphénols est masqué par l'effet neuroinflammatoire du PEG 200 dans l'hippocampe des souris.

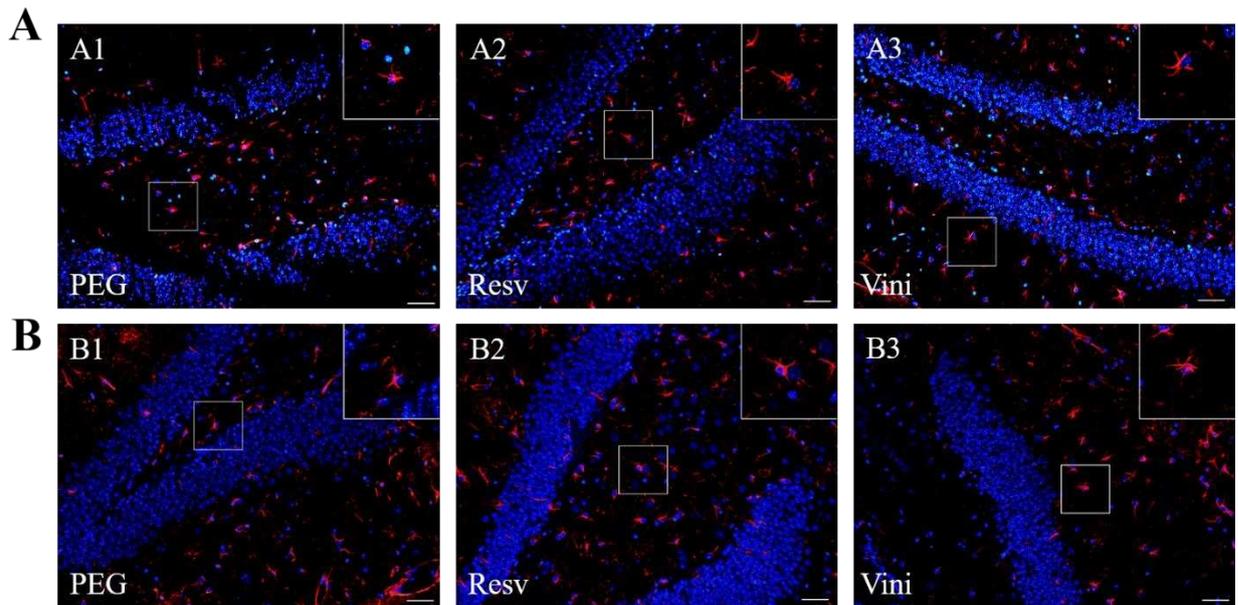


Figure 52 : Marquage par IF de la GFAP chez les souris sauvages et APPswePS1dE9

Les astrocytes ont été marqués en rouge avec l'anticorps dirigé contre GFAP et les noyaux en bleu par le DAPI

A : souris sauvages traitées par le PEG 200 (A1), le resvératrol (A2) et la viniférine (A3)

B : souris APPswePS1dE9 traitées par le PEG 200 (B1), le resvératrol (B2) et la viniférine (B3)

Sur chaque image un zoom X20 a été réalisé. Echelle : 50 μm

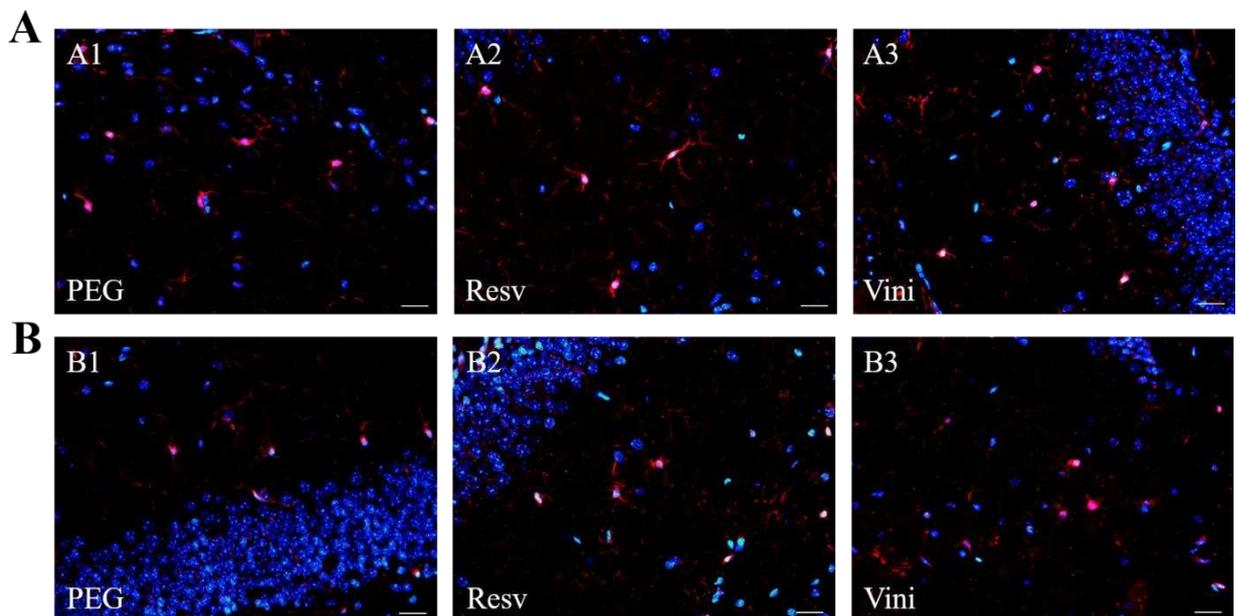


Figure 53 : Marquage par IF de IBA1 chez les souris sauvages et APPswePS1dE9

La microglie a été marquée en rouge avec un anticorps dirigé contre IBA1 et les noyaux en bleu par le DAPI

A : souris sauvages traitées par le PEG 200 (A1), le resvératrol (A2) et la viniférine (A3)

B : souris APPswePS1dE9 traitées par le PEG 200 (B1), le resvératrol (B2) et la viniférine (B3)

Echelle : 100 μm

Dans ce deuxième volet, l'analyse par immunofluorescence des dépôts amyloïdes hippocampiques des souris APPswePS1dE9 traitées par la viniférine montre une baisse de l'intensité de ces dépôts avec un effet plus marqué chez les mâles. Les résultats de l'analyse comportementale ne permettent pas de mettre en évidence un effet des polyphénols sur le déclin mnésique des souris APPswePS1dE9.

L'ensemble de ces résultats est résumé dans la table 9.

Volet 2 (traitement de 3 à 12 mois)				
Paramètres étudiés	Resvératrol		Viniférine	
Dépôts amyloïdes	Diminution de la taille et de la densité des plaques (IF)			
	♂	♀	♂	♀
	- 20 % (NS)	+ 4 % (NS)	- 66 % **	- 20 % (NS)
Neuroinflammation	Effet non visible (Effet pro-inflammatoire du PEG 200)			
Déclin mnésique	Pas d'effet (WM)			

Table 9 : Récapitulatif de la comparaison des effets du resvératrol et de la viniférine administrés entre 3 et 12 mois

*PEG vs Polyphénols : ** P < 0,005*

3 Volet 3

Comparaison des effets *in vitro* de différents polyphénols sur le métabolisme de l'APP

Dans ce troisième volet, l'étude de l'effet des polyphénols sur le métabolisme de l'APP dans un modèle cellulaire de la MA nous semblait judicieux afin d'obtenir des résultats rapidement et *a priori* plus reproductibles qu'*in vivo*. Ainsi cette étude a été réalisée dans le but de comparer la capacité de différents polyphénols à réduire ou non la voie amyloïdogène *in vitro*.

Pour cela les cellules SH-SY5Y_{APP^{swE}} ont été traitées durant 24 heures par l'un des polyphénols (viniférine, resvératrol, gnétine C, quercétine, myricétine et EGCG) à la concentration de 20 μ M ou par leur véhicule respectif :

D50 : dantrolène 50 μ M (véhicule : DMSO)

D10 : dantrolène 10 μ M (véhicule : DMSO)

Vini : viniférine 20 μ M (véhicule : PEG 200)

Resv : resvératrol 20 μ M (véhicule : PEG 200)

EGCG : EGCG 20 μ M (véhicule : PEG 200)

GC : gnétine C 20 μ M (véhicule : PEG 200)

Que : quercétine 20 μ M (véhicule : PEG 200)

Myr : myricétine 20 μ M (véhicule : PEG 200)

La concentration de 20 μ M a été déterminée en se basant sur des expériences précédemment décrites dans la littérature et à la suite d'un test de viabilité cellulaire (MTS) réalisé au laboratoire, qui a montré que cette concentration n'était pas toxique pour les cellules.

Dans un premier temps, l'étude du métabolisme a été réalisée de manière indirecte, en évaluant l'expression des sécrétases et de leurs produits d'activité par western blot. Ainsi, ont été évaluées les expressions d'ADAM10 (enzyme ayant une activité d' α -sécrétase) et de BACE1 (enzyme ayant une activité de β -sécrétase). Par ailleurs, l'expression des fragments C-terminaux C83 et C99 d'APP, ainsi que de NOTCH1 clivé, résultant des activités des α -, β - et γ -sécrétases respectivement, a été également évaluée par western blot.

Dans un deuxième temps, les activités des α - et β -sécrétases ont été quantifiées à l'aide de kits enzymatiques commerciaux, utilisant des substrats spécifiques, après un traitement des cellules par la viniférine ou le resvératrol, afin d'évaluer la capacité éventuelle de ces deux polyphénols à moduler l'activité enzymatique de ces 2 sécrétases.

Les résultats obtenus par western blot pour les différents polyphénols concernant l'expression de ADAM10 et BACE1 présentent une très grande variabilité. En effet malgré une répétition de l'expérience (n = 6 expériences indépendantes), la trop grande variabilité d'expression d'ADAM10 et de BACE1 après traitement avec les différents polyphénols ne nous permettent pas de conclure quant à une action significative sur le métabolisme de l'APP de l'un de ces polyphénols (**figure 54**).

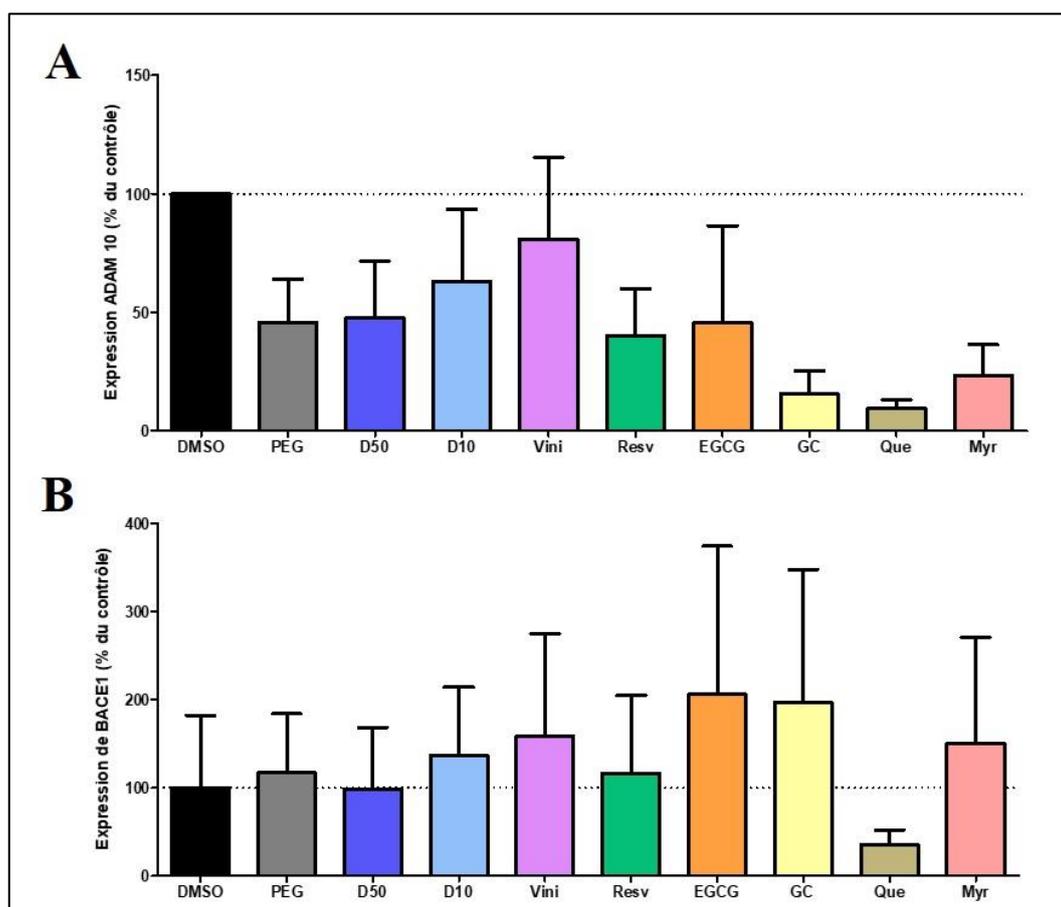


Figure 54 : Effets des polyphénols sur l'expression des sécrétases

A : Expression d'ADAM10 (% par rapport au contrôle DMSO)

B : Expression de BACE1 (% par rapport au contrôle DMSO)

Test statistique de Mann-Whitney (n = 6)

L'expression des fragments C-terminaux C83 et C99 (générés par l'action protéolytique des α - et β -sécrétases respectivement), ainsi que l'expression de NOTCH1 clivé (généré par l'action protéolytique de la γ -sécrétase), ne sont pas modifiées de manière significative après traitement avec les différents polyphénols, suggérant une absence d'effet de ces polyphénols sur l'activité des sécrétases (**figure 55**). Nous constatons de plus une inefficacité de l'action du dantrolène (50 mM) pourtant décrit dans la littérature comme induisant une diminution de l'expression du fragment C99.

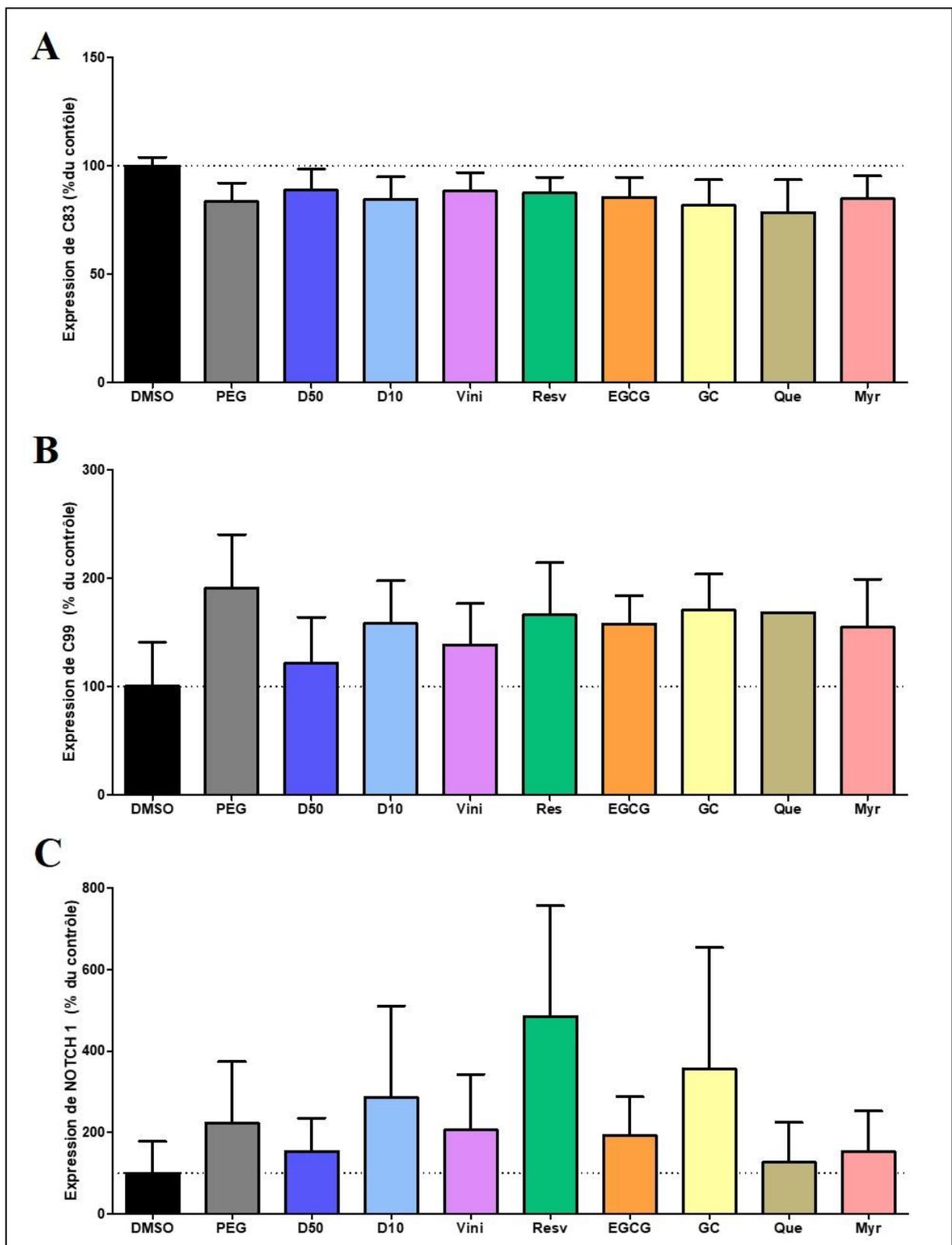


Figure 55 : Effets des polyphénols sur l'expression des fragments issus du clivage de l'APP par les sécrétases

A : Expression du fragment C83 de l'APP (% par rapport au contrôle DMSO)

B : Expression du fragment C99 de l'APP (% par rapport au contrôle DMSO)

C : Expression de NOTCH1 clivé (% par rapport au contrôle DMSO)

Test statistique de Mann-Whitney (n = 6)

Dans un deuxième temps, nous avons tenté de quantifier directement l'activité des α - et β -sécrétases par des kits de mesure d'activité enzymatique avec des substrats spécifiques (**figure 56**). Malheureusement, encore une fois, cette expérience ne nous a pas permis de mettre en évidence un effet de la viniférine et ou du resvératrol sur le métabolisme de l'APP. On peut remarquer que l'activité basale de ces sécrétases est très faible dans ce modèle cellulaire, ce qui rend difficilement détectable toute diminution de celle-ci.

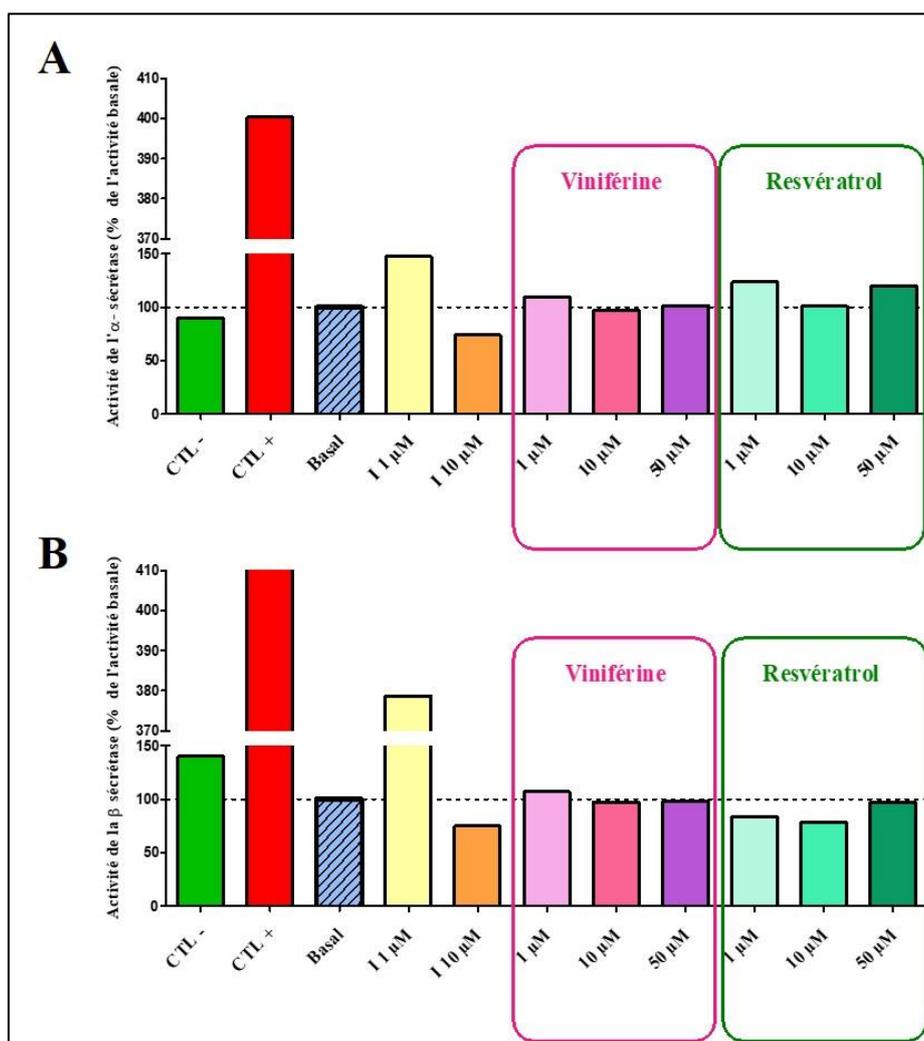


Figure 56 : Effets de la viniférine et du resvératrol sur les activités enzymatiques des sécrétases

A : Activité de l' α -sécrétase (% activité basale)

B : Activité de la β -sécrétase (% activité basale)

I : Inhibiteur interne du kit enzymatique

L'étude des effets des polyphénols sur le métabolisme de l'APP dans ce modèle cellulaire de la MA ne permet pas de conclure, en raison de la non-reproductibilité des résultats et de la maîtrise imparfaite de ce modèle cellulaire.

Discussion et perspectives

Dans les 3 volets de cette thèse, nous avons cherché à comparer les effets de la viniférine et du resvératrol sur la réduction des dépôts amyloïdes, la neuroinflammation et le déclin mnésique dans un modèle murin de la MA ainsi que sur le métabolisme de l'APP dans un modèle cellulaire.

Ainsi, pour l'étude *in vivo*, nous avons utilisé le modèle de souris transgéniques APP^{swe}PS1^{dE9} qui présente plusieurs lésions histopathologiques caractéristiques de la MA, des dépôts amyloïdes et une neuroinflammation, de même qu'un déclin mnésique quantifiable par des études comportementales. Pour l'étude *in vitro*, nous avons utilisé le modèle cellulaire SH-SY5Y_{APP^{swe}} qui est une lignée surexprimant l'APP humain muté.

Nous avons démontré que la viniférine réduisait, avec une efficacité supérieure à celle du resvératrol, l'intensité des dépôts amyloïdes lorsqu'elle était administrée **entre 7 et 11 mois**, tandis que ces deux polyphénols prévenaient de manière partielle et équivalente le déclin mnésique et n'avaient pas d'effet visible sur la neuroinflammation, qui semble être induite par le véhicule PEG 200.

Ces mêmes traitements, administrés **entre 3 et 12 mois**, ont eu des effets différents. En effet, seule la viniférine a réduit l'intensité des dépôts amyloïdes mais la réduction moyenne de l'ensemble des souris a été deux fois moins importante que lorsque ce traitement a été administré entre 7 et 11 mois. Néanmoins, la quantification de l'intensité de ces dépôts en séparant mâles et femelles a permis de montrer une réduction plus importante chez les mâles (- 66 %, P < 0,005) que chez les femelles (- 20 %, NS). De plus, une prévention partielle du déclin mnésique par ces deux polyphénols n'a pas été mise en évidence.

Les résultats de l'étude du métabolisme de l'APP *in vitro* ne nous ont pas permis de mettre en évidence un effet significatif des polyphénols sur l'activité des enzymes impliquées dans les différentes voies du métabolisme. Ce dernier point doit néanmoins continuer à être étudié de façon plus précise car nos expérimentations *in vitro* n'ont pas donné de résultats exploitables.

1 Effet de la viniférine *versus* le resvératrol *in vivo*

A notre connaissance, la comparaison des effets de la viniférine avec ceux d'un polyphénol de référence comme le resvératrol n'avait jamais été effectuée dans des modèles animaux de la MA. En effet, si une étude précédemment réalisée au laboratoire a démontré une réduction par la viniférine de la taille et la densité des plaques amyloïdes ainsi que de la neuroinflammation dans un modèle murin de la MA (Caillaud et al., 2019), aucune étude n'a comparé ces effets avec ceux

du resvératrol jusqu'à un âge permettant de quantifier le déclin mnésique décrit dans le modèle de souris APPswePS1dE9.

Le premier volet de l'étude *in vivo* a donc permis de comparer les effets « curatifs » de la viniférine et du resvératrol chez des souris APPswePS1dE9 traitées de façon hebdomadaire par injection par voie i.p. **de 7 à 11 mois** avec une dose de 20 mg/kg, tandis que le deuxième volet a eu pour but de comparer les effets « préventifs » de ces deux polyphénols dans le cadre d'un traitement sur le long cours **de 3 à 12 mois**.

1.1 Comparaison des effets de la viniférine et du resvératrol sur les plaques amyloïdes

Lorsque les polyphénols ont été administrés **entre 7 et 11 mois**, il est apparu une efficacité significativement supérieure de la viniférine par rapport au resvératrol dans la réduction de la taille et la densité des plaques amyloïdes hippocampiques chez les souris APPswePS1dE9, visibles par IF. Ce résultat ainsi que la baisse significative de la charge amyloïde insoluble, évaluée par ELISA, sont cohérents avec l'analyse d'imagerie par TEP-scan, utilisant le radiotracer [¹⁸F]Florbetaben. Ces effets des polyphénols sur les plaques amyloïdes sont en accord avec des données de la littérature qui ont démontré que le resvératrol, administré par voie orale à la dose de 16 mg/kg/jour, réduisait les plaques amyloïdes marquées avec la thioflavine S, après 10 mois de traitement dans le même modèle de souris APPswePS1dE9 (Porquet et al., 2014).

Le radiotracer [¹⁸F]Florbetaben est validé pour l'étude des dépôts amyloïdes par imagerie TEP-scan, des études antérieures utilisant ce traceur ayant montré une radioactivité accrue chez les souris vivantes APPswePS1dE9 comparées aux souris sauvages à partir de 12 mois dans le cortex (Rominger et al., 2013) et l'hippocampe (Stenzel et al., 2019). Cependant il faut noter qu'une étude longitudinale par TEP-scan avec une comparaison des plaques amyloïdes au début et à la fin de l'étude pour chaque souris aurait été plus judicieuse pour évaluer l'effet réel individuel des polyphénols **entre 7 et 11 mois**. C'est d'ailleurs ce qui est préconisé dans la plupart des études étudiant la progression de la MA (Maeda et al., 2007 ; Poisnel et al., 2012).

Lorsque l'administration des polyphénols a été réalisée **de 3 à 12 mois** (volet 2), la viniférine a également induit une diminution significative de l'intensité des dépôts amyloïdes dans l'hippocampe des souris APPswePS1dE9 mais moindre que lorsque le traitement a été administré de 7 à 11 mois et le resvératrol n'a pas eu d'effet. Cependant un effet sexe se dégage de ce deuxième volet. En effet, les souris mâles traitées par la viniférine ont une intensité des dépôts amyloïdes significativement moins importante que les souris ayant reçu le véhicule. Cette

diminution est bien moindre chez les femelles et non significative, ce qui amène à mettre en avant le phénotype Alzheimer plus grave des femelles APPSwePS1dE9, chez lesquelles la viniférine, administrée dans ces conditions, ne permet plus la réduction des dépôts amyloïdes à l'âge de 12 mois. La constatation de ce phénotype Alzheimer aggravé chez les femelles APPSwePS1dE9 est décrit dans la littérature. En effet, il a été mis en évidence chez les souris femelles une charge amyloïde plus importante et un nombre de plaques marquées à la thioflavine S plus élevé dans l'hippocampe par rapport aux souris mâles du même âge, à 12 et à 17 mois (Wang et al., 2003).

La viniférine pourrait avoir une action sur le ralentissement de la formation des dépôts amyloïdes, par inhibition de l'agrégation du peptide amyloïde ou par induction de la désagrégation de celui-ci. Le mécanisme d'action précis de la viniférine demeure cependant inconnu. Une hypothèse permettant d'expliquer les résultats de ce volet 2 (administration **entre 3 et 12 mois**) pourrait être que la viniférine ne puisse plus avoir une action suffisante lorsque les dépôts deviennent trop importants. Cette action bénéfique pourrait ainsi être dépassée par la pathogénicité de la MA. La fenêtre thérapeutique semblant étroite, une augmentation de la dose de viniférine semble cependant inutile, d'autant plus que la viniférine est toxique à la dose de 50 mg/kg. Une seconde hypothèse permettant d'expliquer ces résultats pourrait faire intervenir l'effet neuroinflammatoire du PEG 200. Le traitement avec le PEG 200 **de 7 à 11 mois** a induit un effet neuroinflammatoire, se traduisant par une augmentation de la réactivité des astrocytes et de la microglie ainsi que de l'expression de la cytokine IL-1 β . On peut supposer que le traitement avec le PEG 200 (seul ou avec les polyphénols) durant 9 mois, **de 3 à 12 mois** a eu un effet pro-inflammatoire supérieur. Or la composante inflammatoire est très impliquée dans l'évolution de la pathologie Alzheimer. On ne peut pas exclure que dans ce deuxième volet, les effets de la viniférine sur les dépôts amyloïdes aient été au moins partiellement masqués par les effets délétères du PEG 200, notamment chez les souris femelles dont le phénotype Alzheimer est plus avancé. En effet, il a été démontré que les médiateurs de l'inflammation tels que l'IL-1 β ou le TNF- α induisent l'expression de BACE1 et augmentent l'activité de la γ -sécrétase, conduisant à la libération d'A β dans les astrocytes, suggérant que les astrocytes contribuent au phénomène d'amyloïdose de la MA (Cho et al., 2007 ; Hong et al., 2003). Il ne faut pas non plus négliger dans cette étude un éventuel effet de ce véhicule ou des polyphénols sur les A β . En effet, la diminution des plaques amyloïdes n'est pas corrélée avec une réduction de la gravité de la démence. Il serait donc nécessaire d'évaluer la concentration des A β , les formes les plus toxiques de l'A β , pour déterminer si les effets de la viniférine sont réellement bénéfiques dans le cadre de la MA.

1.2 Comparaison des effets de la viniférine et du resvératrol sur le métabolisme de l'APP

Dans le volet 1 de l'étude *in vivo*, le métabolisme de l'APP a été étudié de façon indirecte et seulement partiellement par quantification par western blot de l'expression du fragment C-terminal C99, libéré par le clivage de l'APP par la β -sécrétase, dans l'hippocampe des souris APPswePS1dE9. Lorsque les polyphénols ont été administrés de 7 à 11 mois, nous avons constaté une diminution significative de l'expression du fragment C99 chez souris APPswePS1dE9 traitées par la viniférine alors que le traitement avec le resvératrol n'a induit aucune modification de cette expression. Ce dernier résultat concorde avec celui décrit dans l'étude de *Porquet et al* qui ne montre aucun effet du resvératrol sur l'expression du fragment C99 (Porquet et al., 2014). Quant à l'effet de la viniférine sur cette expression, aucune autre étude *in vivo* n'a été auparavant publiée, ce qui ne nous permet pas de comparer ce résultat.

Cette baisse d'expression du fragment C99 dans l'hippocampe des souris traitées par la viniférine pourrait refléter une action de la viniférine sur le métabolisme de l'APP et notamment au niveau de l'activité de la β -sécrétase. Malheureusement, pour pouvoir confirmer cette hypothèse, une quantification de l'activité de la β -sécrétase par un test enzymatique aurait été judicieuse mais rendue impossible par la présence d'inhibiteurs de protéases dans le tampon de lyse des homogénats protéiques. De plus, l'analyse d'une modification de l'expression d'autres fragments issus des voies amyloïdogène et non-amyloïdogène, comme les fragments C83, sAPP α et sAPP β , permettrait d'avoir une vision plus globale de l'effet de la viniférine sur le métabolisme de l'APP. Ainsi, la mise au point de la détection de ces fragments C83 ou des fragments sAPP α et sAPP β pourrait être une perspective pour la suite de l'étude

1.3 Comparaison des effets de la viniférine et du resvératrol sur le déclin mnésique

Plusieurs paramètres ont été analysés dans cette étude avec dans un premier temps l'évaluation des capacités mnésiques de chaque souris à un moment précis (3 et 11 mois dans le volet 1 ; 3, 6 et 12 mois dans le volet 2). Dans un deuxième temps, l'évaluation de la variation du temps de rétention entre le début et la fin du traitement, permettant de s'affranchir des variabilités interindividuelles observées lors des mesures des temps de rétention, nous a permis de connaître l'évolution mnésique de chaque souris donc d'estimer le déclin mnésique entre le début et la fin de l'étude (de 7 à 11 mois pour le volet 1 et de 3 à 12 mois pour le volet 2).

Dans le premier volet de la thèse (traitement de 7 à 11 mois), aucun déficit mnésique n'est observé à 11 mois chez les souris APPswePS1dE9 par rapport souris sauvages. De plus, les polyphénols ne semblent avoir aucun effet sur les capacités mnésiques des souris APPswePS1dE9. Cependant, lors de l'analyse de la variation du temps de rétention entre 7 et 11 mois, les souris APPswePS1dE9 traitées par les polyphénols présentent une variation positive en comparaison des souris traitées par le véhicule. Les polyphénols semblent donc tous les deux prévenir partiellement et de manière équivalente le déclin mnésique des souris APPswePS1dE9 lorsqu'ils sont administrés entre 7 et 11 mois. Ce résultat est en accord avec la littérature, montrant un effet positif du resvératrol sur le déclin mnésique avec le test de la piscine de Morris. En effet, l'administration par voie orale du resvératrol à la dose de 60 mg/kg pendant 60 jours consécutifs chez des souris 5XFAD âgé de 5 mois améliore la mémoire spatiale (Chen et al., 2019). Ce même résultat est également retrouvé chez le rat adulte ayant subi une injection d'A β ₁₋₄₂ dans l'hippocampe et chez lequel le resvératrol a également été directement injecté dans la même structure cérébrale, à une dose variant de 0,5 à 44 μ M (Wang et al., 2017).

A contrario, lorsque le traitement par les polyphénols a été administré de 3 à 12 mois (volet 2), un déficit mnésique après analyse du temps de rétention à 12 mois est bien observé chez les souris APPswePS1dE9 par rapport aux souris sauvages. Ce résultat est en accord avec la littérature qui décrit un déficit des capacités mnésiques à 12 mois (Savonenko et al., 2005). Ce résultat est observé chez les souris quel que soit le traitement, ce qui laisse supposer que ces molécules (PEG 200 seul ou avec l'un des polyphénols) ne modifient pas les capacités mnésiques de ces souris sauvages et APPswePS1dE9. Toutefois, de façon surprenante, la variation du temps de rétention diminue (de façon non significative) chez les souris sauvages traitées par la viniférine par rapport aux souris sauvages traitées par le véhicule, ce qui n'est pas le cas des souris APPswePS1dE9. La conséquence est l'absence de différence significative de la variation du temps de rétention entre les souris sauvages et les souris APPswePS1dE9 ayant été traitées par la viniférine. Nous n'avons pas d'explication rationnelle à cette constatation, qui est peut-être due à la grande variabilité des résultats dans chacun des groupes.

L'absence d'effet bénéfique du resvératrol chez ces souris APPswePS1dE9 est surprenante. En effet, chez ces mêmes souris, le resvératrol administré par voie orale a été décrit comme améliorant la mémoire à court terme (Porquet et al., 2014). La différence du mode d'administration entre cette étude et la nôtre peut cependant expliquer cette différence. Toutefois, aucune donnée scientifique ne relate de résultats concernant l'effet de la viniférine et / ou du resvératrol injecté par voie i.p. pendant une durée de 9 mois consécutifs sur la mémoire spatiale de ces souris APPswePS1dE9.

L'absence d'amélioration du déclin mnésique malgré le traitement avec les polyphénols, observée dans ce deuxième volet de la thèse (traitement de 3 à 12 mois) est donc peut être un symptôme de la MA devenu trop important pour espérer voir un effet compensateur de la viniférine et du resvératrol même avec un traitement sur le long cours depuis l'âge de 3 mois. Cependant il ne faut pas non plus négliger dans cette étude l'effet neuroinflammatoire du véhicule, le PEG 200, qui pourrait avoir une action sur les capacités mnésiques des souris. Comme dit précédemment, on ne peut exclure que le PEG 200 administré durant 9 mois, par son effet neuroinflammatoire, favorise la formation des dépôts amyloïdes et/ou influe sur la concentration des A β et par conséquent ait également un effet délétère sur le déclin mnésique. Ainsi, l'effet bénéfique des polyphénols sur le déclin mnésique pourrait être masqué, au moins partiellement, par l'effet délétère du PEG 200.

La comparaison au niveau comportemental entre ces 2 premiers volets de la thèse est impossible, ce test comportemental n'ayant pas été réalisé aux mêmes temps dans les 2 études. En effet, dans le volet 2 (**de 3 à 12 mois**), un test comportemental intermédiaire a été ajouté entre le début et la fin de l'étude, à 6 mois. Dans le volet 1 de l'étude (**de 7 à 11 mois**), l'intervalle entre les 2 évaluations comportementales du début et de la fin est de 4 mois sans test intermédiaire sur la durée de l'étude. Le fait de rajouter un test comportemental à 6 mois dans le volet 2 de l'étude a probablement amélioré l'apprentissage par les souris APP^{swePS1dE9} de la mémoire spatiale, impliquant un rappel de cette mémoire. Afin de pallier ce problème, il aurait peut-être été judicieux dans ce deuxième volet de déplacer la plateforme entre les 3 sessions de comportement afin de ne pas impliquer un rappel de l'emplacement de la plateforme.

Le fait d'utiliser un seul test comportemental dans cette étude est critiquable. En effet, il est courant d'associer plusieurs tests comportementaux faisant intervenir la mémoire épisodique et ou relationnelle (Chen et al., 2019 ; Cheng et al., 2013). Ainsi l'utilisation du test de reconnaissance d'objet permettant d'évaluer la mémoire « episodic-like » ou mémoire épisodique chez le rongeur aurait pu être associé au WM (Bengoetxea et al., 2015 ; Bensalem et al., 2018). Par ailleurs, la capacité des animaux à effectuer l'apprentissage et à faire preuve de flexibilité est aussi dépendante de l'intégrité de l'hippocampe (Marigetto et al., 1999). Ainsi, l'utilisation du labyrinthe radiaire (labyrinthe à 8 bras) dans lequel certains bras sont appâtés et d'autres non, aurait été une façon d'évaluer la mémoire relationnelle et donc l'intégrité de l'hippocampe chez les souris APP^{swePS1dE9}.

1.4 Comparaison des effets de la viniférine et du resvératrol sur l'inflammation

Lorsque les polyphénols ont été administrés entre 7 et 11 mois (volet 1), aucune différence significative des marqueurs de l'inflammation entre les souris APPswePS1dE9 traitées par les polyphénols et celles ayant reçu le véhicule n'a été mise en évidence. L'apparente absence d'efficacité de ces polyphénols sur la réduction de l'inflammation était contradictoire avec les résultats de précédentes études *in vivo* démontrant une action anti-inflammatoire du resvératrol et de la viniférine. En effet il a été démontré dans les cultures primaires d'astrocytes que le resvératrol inhibait la production de médiateurs inflammatoires induite par le LPS, comme l'oxyde nitrique (NO), le TNF- α et les interleukines IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-23 (Wight et al., 2012). De même, dans un modèle de lésion inflammatoire induite par l'A β dans les cellules microgliales murines (cellules BV-2), il a été montré que le resvératrol avait un effet anti-inflammatoire (Feng and Zhang, 2019). Enfin, il a été montré précédemment au laboratoire que la viniférine inhibait avec une meilleure efficacité la sécrétion de TNF- α et d'IL-6 dans un modèle cellulaire de la MA, une co-culture primaire de neurones, astrocytes et microglie traitée par le peptide A β préalablement agrégé et l'IL-1 β (Vion et al., 2018). Par ailleurs, l'administration hebdomadaire par injection par voie i.p. de viniférine à la dose de 10 mg/kg de 3 à 6 mois a induit une diminution de la réactivité astrocytaire et microgliale chez le même modèle animal APPswePS1dE9 (Caillaud et al., 2019). Dans cette dernière étude, la viniférine était également solubilisée dans le PEG 200, mais la dose était deux fois moins importante et la durée de traitement également moindre (3 mois au lieu de 4 ou 9 mois). Par ailleurs elle ne comportait pas de groupe contrôle de souris sauvages.

Dans notre étude, après comparaison des souris APPswePS1dE9 et sauvages traitées par le véhicule des polyphénols, le PEG 200, il est apparu un niveau d'inflammation similaire dans l'hippocampe des souris sauvages, laissant présager un effet inflammatoire du véhicule PEG 200, qui n'avait jamais mis en évidence auparavant dans les précédentes études. Nous avons effectivement confirmé cette hypothèse (article 2). L'analyse des marqueurs de l'inflammation GFAP et IBA1 par IF et western blot devient donc difficilement exploitable du fait de l'action inflammatoire du PEG 200 dans l'hippocampe, biaisant une partie des résultats. Pourtant, malgré cet effet délétère du PEG 200 sur les cellules de l'inflammation, l'analyse TEP-scan a montré une différence significative d'intensité du marquage TSPO hippocampique entre les souris traitées par la viniférine et celles traitées par le resvératrol. Ce marquage, moins élevé chez les souris traitées par la viniférine, démontre une activation microgliale moins importante. Même si une étude longitudinale aurait été plus judicieuse dans cette étude, l'analyse de ce troisième marqueur de

l'inflammation plus spécifique d'une activité microgliale pourrait peut-être s'affranchir des effets du PEG 200. Afin de tester cette hypothèse au laboratoire, le marquage par IF de la microglie activée avec un anticorps dirigé contre CD68 et / ou TSPO aurait pu être une solution permettant de comparer les résultats de l'imagerie par TEP-scan avec ceux d'IF, comme réalisé dans une autre étude (Sérrière et al., 2015). En effet, l'anticorps dirigé contre CD68, dont l'utilisation est maîtrisée au laboratoire, marque le lysosome et est donc généralement considéré comme un marqueur de la microglie phagocytaire activée. De plus, son expression est positivement corrélée au déclin cognitif (Minett et al., 2016). Au vu de ces premiers résultats, une étude très limitée des marqueurs de l'inflammation a été réalisée dans le volet 2 (traitement de 3 à 12 mois) du fait de l'activité inflammatoire du PEG 200 dans l'hippocampe.

Toutefois, on peut noter que cet effet du véhicule n'a été observé que dans l'hippocampe et une partie du cortex entorhinal (données non publiées). Il se pourrait donc qu'à ce stade les cortex frontal et antérieur soient préservés de ce phénomène. Ainsi une analyse complète des marqueurs de l'inflammation dans les différentes régions du cerveau aurait pu être réalisée.

2 Le choix du véhicule PEG 200 remis en question

En raison des effets inflammatoire du PEG 200 dans l'hippocampe des souris, le choix de ce véhicule pourtant largement utilisé dans la littérature (Gu et al., 2019 ; Ren et al., 2017) est *a posteriori* inadéquat. Cet excipient a été choisi en raison de la non-solubilité de la viniférine dans le NaCl (à 0,9 %) et du fait d'une neurotoxicité du PEG 200 semblant inférieure à celle du DMSO. De plus, le PEG contribue à la protection des médicaments auxquels il se lie par phénomène de PEGylation et peut traverser la BHE (McClung et al., 1990). La dose administrée de 20 mg/kg était bien inférieure à la DL₅₀ (décrite à la dose de 7,5 mL/kg pour une injection par voie i.p. chez la souris) (Worthley and Schott, 1965), seule donnée de toxicité à notre disposition. Cependant, l'injection répétée de ce solvant entraîne une immunoréactivité des cellules microgliales et astrocytaires accompagnée d'une augmentation du niveau de cytokine pro-inflammatoire IL-1 β dans l'hippocampe (article 2). Ce phénomène pro-inflammatoire du PEG 200 n'avait jamais été constaté au laboratoire sans doute en raison de l'absence d'inclusion de souris sauvages dans la précédente étude *in vivo* (Caillaud et al., 2019), mais également parce que le volume injecté était 2 fois moins important et la durée des injections également moindre (3 mois au lieu de 4 (ou 9) mois). Le choix de ce véhicule est donc susceptible de biaiser une partie des résultats concernant des études sur l'inflammation comme cela a été le cas dans notre étude. Le véhicule ou la voie d'administration doivent être changés pour les futures études. Le remplacement du PEG 200 par

un autre véhicule permettant de solubiliser les polyphénols reste délicat en raison de la faible solubilité de ces polyphénols. Concernant la voie d'administration, la présence d'une dose orale de polyphénols dans l'alimentation sous forme de croquettes pourrait être une solution pour éviter ce phénomène inflammatoire du PEG 200 et aurait l'avantage d'être moins invasif que des injections hebdomadaires pour les souris. Cependant, cette voie d'administration ne permet pas de contrôler facilement la dose ingérée par chaque animal en un temps donné. La prise orale par gavage, qui permettrait la maîtrise totale de la dose administrée, peut être également envisagée.

3 Le choix du modèle animal remis en question

Les souris APP^{swe}PS1^{dE9} sont couramment utilisées dans les études expérimentales sur la MA. Cependant ce modèle présente des limites. En effet, il s'agit de souris exprimant les mutations humaines responsables des rares formes génétiques autosomales dominantes de la MA. Celles-ci concernent moins de 1 % des patients atteints de la MA qui, pour la plupart, présentent une forme dite sporadique. Ce modèle de souris exprime les principales lésions histopathologiques (dépôts amyloïdes, neuroinflammation, mort neuronale cholinergique dans les stades tardifs) et symptômes de la MA (déclin mnésique) mais reste éloigné des formes sporadiques de la MA, pour lesquelles un traitement est activement recherché. Par ailleurs, dans ce modèle animal, des lésions histopathologiques caractéristiques de la MA sont absentes, les DNFs générées par la protéine TAU hyperphosphorylée. Or il est établi depuis de nombreuses années maintenant que la protéine TAU joue un rôle important dans la dégénérescence progressive des neurones faisant de cette protéine une autre cible thérapeutique pour la recherche de nouveaux traitements contre la MA (Hung and Fu, 2017 ; Mi and Johnson, 2006). Cependant, il n'existe aucune mutation de TAU liée aujourd'hui spécifiquement à la MA. Il existe probablement une voie qui mène de l'agrégation β -amyloïde à l'agrégation de TAU, mais dont le mécanisme reste peu clair. Ainsi, les modèles de souris actuels utilisent des mutations de TAU impliquées dans un autre trouble cognitif de l'Homme, connu sous le nom de démence frontotemporale (King, 2018). Certaines études ont démontré l'efficacité de polyphénols sur la phosphorylation de la protéine TAU (Freyssin et al., 2020 ; Porquet et al., 2013 ; Sun et al., 2019). Il existe par exemple un modèle triple transgénique 3xTg-AD combinant la mutation swedish de l'APP, la mutation M146V de la PS1 et la mutation 301L de TAU. Ce modèle aurait pu être pertinent mais il n'est malheureusement pas maîtrisé au laboratoire, limitant notre étude au modèle APP^{swe}PS1^{dE9}.

Conclure sur l'efficacité de la viniférine sur la MA ne peut donc se faire que partiellement avec l'utilisation de ce modèle animal, un bon modèle d'amyloïdose, mais qui ne semble pas vraiment

représenter la « cascade amyloïde ». Afin de pallier ces problèmes de modèles animaux « imparfaits », le National Institute on Aging américain a confié à un groupe de chercheurs en 2016 la tâche de développer des modèles murins qui reflètent plus fidèlement la MA. Ce consortium vise à créer un modèle illustrant avec précision la forme sporadique de la MA chez la souris. Il en est ressorti la création d'un premier modèle de souris qui incorpore la variante $\epsilon 4$ du gène *APOE* (étroitement associée à un risque accru de la forme sporadique de la MA), ainsi qu'une variante du gène *TREM2*, qui code pour un récepteur de surface cellulaire microglial qui augmente jusqu'à 4 fois le risque de développer une MA sporadique (Williams et al., 2018). De plus, l'utilisation actuelle des technologies d'édition génomique CRISPR s'avère très utile pour associer des variants génétiques identifiés comme facteurs de risque et pouvant conduire à la création de modèles animaux pertinents. En attendant de pouvoir accéder à ces nouveaux modèles animaux et afin de se rapprocher de l'Homme, l'utilisation des primates non-humains peut être envisagée par les chercheurs. Bien que ceux-ci, qui comprennent les macaques et les ouistitis, ne soient pas connus pour développer la MA comme les humains, ils accumulent des dépôts β -amyloïdes dans leur cerveau. Le cerveau de ces animaux subit également des changements structurels et biochimiques en vieillissant qui reflètent ceux observés chez les humains (Li et al., 2019). Cependant, la plupart de ces primates ne développent pas d'enchevêtrements de TAU et leur utilisation dans la recherche s'accompagne d'une multitude de défis pratiques et de considérations éthiques rendant ces modèles difficilement utilisables. Pourtant, un modèle primate du trouble neurodégénératif de la MP a été créé et a permis des avancées majeures dans la recherche thérapeutique pour cette maladie (Meissner et al., 2003). Ainsi la validation d'un modèle macaque de la MA serait judicieux avant d'entreprendre des essais cliniques (Van Dam and De Deyn, 2017). En attendant les avancées scientifiques dans ce domaine, le microcèbe (*Microcebus murinus*), appartenant au groupe des lémuriniens et décrit comme présentant des plaques amyloïdes proches de celles présentes dans le cerveau des sujets humains touchés par la MA, présente des avantages par rapport aux autres primates habituellement utilisés en laboratoire. En effet sa petite taille (12 cm) permet une grande facilité d'élevage et de manipulation et sa longévité d'environ 10 ans permet d'étudier les étapes du vieillissement dans des laps de temps raisonnables avec l'observation des premiers signes de vieillissement vers 6 ans contre 15 ans chez le macaque. Plusieurs études ont utilisé ce modèle animal pour chercher à résoudre les questions cruciales concernant à la fois la compréhension de la MA et sa prévention (Bons et al., 2006 ; Marchal et al., 2012 ; Royo et al., 2018).

4 Quid des oligomères d'A β (A β) ?

L'effet neuroinflammatoire du PEG 200 remet en question certains des résultats *in vivo*. Il est notamment impossible d'évaluer l'effet réel du resvératrol et de la viniférine sur l'inflammation hippocampique.

Cependant, il ne faut pas non plus négliger un potentiel effet de ce véhicule, mais également des polyphénols sur les A β et par conséquent sur le déclin mnésique de ces souris. En effet, la diminution des plaques amyloïdes observée avec le traitement avec la viniférine n'est pas corrélée avec la gravité de la démence de type Alzheimer (Lacor et al., 2007 ; Pham et al., 2010). Au cours de la MA, différentes formes et structures du peptide amyloïde existent. Certaines ne sont pas toxiques et c'est l'apparition de certaines formes qui est corrélée à l'altération mnésique (Shankar et al., 2009). Par exemple, les dimères extraits de cerveaux de patients et appliqués sur des préparations électrophysiologiques d'hippocampe de rat inhibent la LTP, un mécanisme jouant un rôle essentiel dans l'apprentissage et la mémoire (Shankar et al., 2008). Par ailleurs, ils déclenchent une hyperphosphorylation de TAU sur les mêmes sites que ceux impliqués dans la MA dans des cultures primaires de neurones (Jin et al., 2011).

Il serait donc nécessaire d'évaluer la concentration des A β , les formes les plus toxiques de l'A β , pour vérifier que les effets de la viniférine seule (sans PEG 200) sont réellement bénéfiques dans le cadre de la MA. Aujourd'hui, cette évaluation est possible par des nouvelles techniques telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN) couplé à la spectrométrie de masse structurale (Ciudad et al., 2020). Cependant, au sein du laboratoire, la mise au point des techniques d'évaluations quantitatives strictes telles que le dot blot et l'ELISA, ou quantitatives relatives, telles que le western blot pourraient être envisagée pour la suite de cette étude. Toutefois, il faut garder à l'esprit qu'il n'existe pas encore d'anticorps ciblant spécifiquement les oligomères de petite taille. Par ailleurs, ces A β ne sont pas stables rendant leur détection par des techniques de biochimie difficile (Ryan et al., 2010).

5 Effets de la viniférine *versus* d'autres polyphénols *in vitro*

Dans le troisième volet de la thèse il nous a paru important de comparer les effets de la viniférine et ceux d'autres polyphénols, décrits dans la littérature pour leurs effets anti-inflammatoires et neuroprotecteurs, sur le métabolisme de l'APP. Pour cette partie du travail, nous avons utilisé le modèle cellulaire SH-SY5Y_{APP^{sw}} fourni par le Dr Checler, qui l'a décrit et utilisé dans certaines études *in vitro* de la MA. Dans un premier temps, l'absence de toxicité des 6 polyphénols, à la

dose de 20 μM a été confirmée. Dans un deuxième temps, ils ont été testés à cette concentration sur ce modèle cellulaire afin de quantifier l'expression des différentes sécrétases ainsi des produits issus du clivage de l'APP par ces sécrétases. Enfin, l'activité de ces sécrétases a été mesurée dans ce modèle cellulaire traité avec la viniférine ou le resvératrol.

5.1 Etude du métabolisme de l'APP par quantification des sécrétases et des produits de leur activité

La quantification par western blot de l'expression d'ADAM10 et de BACE1 a montré qu'un traitement de 24 heures par les différents polyphénols n'induisait aucune différence significative de l'expression de ces sécrétases. Il en est de même pour l'expression des fragments C-terminaux C83, C99 et de NOTCH1 clivé, les produits des activités des α -, β - et γ -sécrétases respectivement. Le métabolisme de l'APP ne semble donc pas être régulé par les polyphénols. Pourtant, la gnétine C, un dimère de resvératrol a démontré son efficacité sur la diminution de l'expression de BACE 1 dans les cellules SH-SY5Y (Seino et al., 2018), de même que le miyabénol C, un trimère de resvératrol (Hu et al., 2015). De plus, la curcumine diminue l'expression de BACE1 et du fragment C99 dans les cellules SH-SY5Y_{APP^{swe}} (Huang et al., 2020). L'expression d'ADAM10 et de BACE 1 a aussi été quantifiée dans ce modèle cellulaire dans une étude expérimentale évaluant la neuroprotection induite par la quercétine et la rutine (Martín-Aragón et al., 2016). Le modèle cellulaire n'est donc certainement pas à remettre en question dans cette étude. Afin d'expliquer ces résultats en contradiction avec la littérature, il faut souligner un manque de maîtrise de ce modèle cellulaire et des techniques utilisées pour cette partie *in vitro*.

En effet, la mise au point difficile des conditions de culture et de traitement, l'intervention de différents expérimentateurs (stagiaires encadrés au laboratoire) et le manque de temps pour résoudre les problèmes techniques au cours de la thèse sont des points permettant d'expliquer l'absence de résultats exploitables. Ce troisième volet mériterait une implication complète de la part d'un expérimentateur sur plusieurs mois consécutifs, afin de mettre au point la technique et de maîtriser la reproductibilité des résultats.

5.2 L'étude enzymatique des sécrétases

L'analyse de l'activité des sécrétases dans le modèle cellulaire SH-SY5Y_{APP^{swe}} s'est elle aussi montrée peu convaincante en raison de l'absence de résultats probants dans le volet 3 de la thèse. Ni la viniférine et ni le resvératrol ne module l'activité des α - et β -sécrétases dans ce modèle cellulaire. Pourtant dans un essai sans cellule, la quercétine et la rutine, utilisés à 100 μM , ont

montré une activité inhibitrice significative de BACE1 (Jiménez-Aliaga et al., 2011). La myricétine, la quercétine, le kaempférol, la morine et l'apigénine ont aussi directement inhibé l'activité enzymatique BACE1 dans un essai sans cellule (Shimmyo et al., 2008). Les seuls résultats probants concernant l'activité de ces sécrétases *in vitro* sur cellules ont été obtenus sur des cultures de neurones et ont montré une activité de la β -sécrétase significativement diminuée par l'administration de myricétine et de quercétine (Shimmyo et al., 2008). Toujours dans des cultures de neurones, l'EGCG a démontré une efficacité indirecte sur l'activité de la β -sécrétase, accompagné d'effets directs sur les activités des α - et γ -sécrétases (Cox et al., 2015). A ce jour aucune étude n'a recherché un effet des polyphénols sur l'activité des sécrétases dans le modèle SH-SY5Y_{APP^{Swe}} bien que ce modèle soit très utilisé pour étudier d'autres phénomènes tels que l'apoptose ou la production d'A β (Silva and Vauzour, 2018). Ceci pourrait expliquer les activités basales des sécrétases très faibles retrouvées dans notre étude, menant à l'hypothèse d'un mauvais choix de modèle cellulaire dans la thèse afin d'évaluer l'activité des sécrétases.

Conclusion

Au début de ces travaux de thèse, aucune étude n'avait comparé les effets de la viniférine et du resvératrol dans un modèle murin de la MA.

Nous avons mis en évidence chez les souris APP^{swePS1dE9}, lorsque les polyphénols étaient administrés **entre 7 et 11 mois** à la dose de 20 mg/kg, que la viniférine avait un effet plus important que le resvératrol sur la diminution des plaques amyloïdes en formation dans l'hippocampe et sur le métabolisme amyloïdogène de l'APP. En revanche, le resvératrol et la viniférine avaient un effet comparable sur la prévention partielle du déclin mnésique. Ces résultats ont été observés quand le traitement a débuté lorsque les lésions histopathologiques de la MA étaient déjà présentes. Lorsque ce même traitement a été initié plus tôt chez ces souris et sur une période plus longue (**de 3 à 12 mois**) afin de comparer les effets préventifs des deux polyphénols, les effets de la viniférine sont restés significatifs en ce qui concerne la réduction des plaques amyloïdes hippocampiques. Cet effet de la viniférine est en accord avec la première étude réalisée au laboratoire démontrant qu'un traitement **entre 3 et 6 mois** présentait un effet préventif sur la formation des plaques amyloïdes et la neuroinflammation (Caillaud et al., 2019). Cependant la réduction de l'intensité des plaques a été moindre que celle observée après le traitement **entre 7 et 11 mois**. En prenant en compte le sexe des souris lors de l'analyse, il s'est avéré que cette réduction des plaques n'était significative que pour les mâles. Par ailleurs, l'effet du resvératrol sur les dépôts amyloïdes décrit dans la littérature, n'a pas été retrouvé. Une des hypothèses évoquées pour expliquer ces derniers faits seraient que les effets bénéfiques des polyphénols soient compensés par l'effet neuroinflammatoire potentiellement délétère du PEG 200, qui pourrait exacerber la pathologie amyloïde à partir d'un certain seuil. Par conséquent, il paraît indispensable d'élargir l'investigation des effets du resvératrol et de la viniférine *in vivo* sur le métabolisme de l'APP, les dépôts amyloïdes, l'inflammation et le déclin mnésique en utilisant un autre véhicule que le PEG 200 ou une autre voie d'administration de ces polyphénols.

Références bibliographiques

- Agostinho, P., Pliássova, A., Oliveira, C.R., Cunha, R.A., 2015. Localization and Trafficking of Amyloid- β Protein Precursor and Secretases: Impact on Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 45, 329–347. <https://doi.org/10.3233/JAD-142730>
- Ahmed, R.R., Holler, C.J., Webb, R.L., Li, F., Beckett, T.L., Murphy, M.P., 2010. BACE1 and BACE2 enzymatic activities in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 112, 1045–1053. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06528.x>
- Aluise, C.D., Robinson, R.A.S., Cai, J., Pierce, W.M., Markesbery, W.R., Butterfield, D.A., 2011. Redox proteomics analysis of brains from subjects with amnesic mild cognitive impairment compared to brains from subjects with preclinical Alzheimer's disease: insights into memory loss in MCI. *J. Alzheimers Dis. JAD* 23, 257–269. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101083>
- Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N., Murtagh, F.R., 1995. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Clin. Anat. N. Y.* N 8, 429–431. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>
- Anandatheerthavarada, H.K., Biswas, G., Robin, M.-A., Avadhani, N.G., 2003. Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J. Cell Biol.* 161, 41–54. <https://doi.org/10.1083/jcb.200207030>
- Aron, P.M., Kennedy, J.A., 2008. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 79–104. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700137>
- Arora, I., Sharma, M., Tollefsbol, T.O., 2019. Combinatorial Epigenetics Impact of Polyphenols and Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20184567>
- Asuni, A.A., Boutajangout, A., Quartermain, D., Sigurdsson, E.M., 2007. Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 9115–9129. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007>
- Augustinack, J.C., Schneider, A., Mandelkow, E.-M., Hyman, B.T., 2002. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 103, 26–35. <https://doi.org/10.1007/s004010100423>
- Bagyinszky, E., Giau, V.V., Shim, K., Suk, K., An, S.S.A., Kim, S., 2017. Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. *J. Neurol. Sci.* 376, 242–254. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.03.031>
- Belyaev, N.D., Kellett, K.A.B., Beckett, C., Makova, N.Z., Revett, T.J., Nalivaeva, N.N., Hooper, N.M., Turner, A.J., 2010. The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a {beta}-secretase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 41443–41454. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.141390>
- Bengoetxea, X., Rodriguez-Perdigon, M., Ramirez, M.J., 2015. Object recognition test for studying cognitive impairments in animal models of Alzheimer's disease. *Front. Biosci. Sch. Ed.* 7, 10–29.
- Bensalem, J., Dudonné, S., Gaudout, D., Servant, L., Calon, F., Desjardins, Y., Layé, S., Lafenetre, P., Pallet, V., 2018. Polyphenol-rich extract from grape and blueberry attenuates cognitive decline and improves neuronal function in aged mice. *J. Nutr. Sci.* 7. <https://doi.org/10.1017/jns.2018.10>

- Bensalem, J., Servant, L., Alfos, S., Gaudout, D., Layé, S., Pallet, V., Lafenetre, P., 2016. Dietary Polyphenol Supplementation Prevents Alterations of Spatial Navigation in Middle-Aged Mice. *Front. Behav. Neurosci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00009>
- Bertelli, A., Bertelli, A.A., Gozzini, A., Giovannini, L., 1998. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp. Clin. Res.* 24, 133–138.
- Bertram, L., Lange, C., Mullin, K., Parkinson, M., Hsiao, M., Hogan, M.F., Schjeide, B.M.M., Hooli, B., Divito, J., Ionita, I., Jiang, H., Laird, N., Moscarillo, T., Ohlsen, K.L., Elliott, K., Wang, X., Hu-Lince, D., Ryder, M., Murphy, A., Wagner, S.L., Blacker, D., Becker, K.D., Tanzi, R.E., 2008. Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 623–632. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.10.008>
- Blennow, K., Zetterberg, H., 2018. Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *J. Intern. Med.* 284, 643–663. <https://doi.org/10.1111/joim.12816>
- Bloom, G.S., 2014. Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol.* 71, 505–508. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.5847>
- Boluda, S., Iba, M., Zhang, B., Raible, K.M., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., 2015. Differential induction and spread of tau pathology in young PS19 tau transgenic mice following intracerebral injections of pathological tau from Alzheimer's disease or corticobasal degeneration brains. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 221–237. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1373-0>
- Bons, N., Rieger, F., Prudhomme, D., Fisher, A., Krause, K.-H., 2006. *Microcebus murinus*: a useful primate model for human cerebral aging and Alzheimer's disease? *Genes Brain Behav.* 5, 120–130. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00149.x>
- Borgstahl, G.E., Parge, H.E., Hickey, M.J., Johnson, M.J., Boissinot, M., Hallewell, R.A., Lepock, J.R., Cabelli, D.E., Tainer, J.A., 1996. Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry* 35, 4287–4297. <https://doi.org/10.1021/bi951892w>
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 82, 239–259. <https://doi.org/10.1007/bf00308809>
- Brion, J.P., Couck, A.M., Passareiro, E., Flament-Durand, J., 1985. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J. Submicrosc. Cytol.* 17, 89–96.
- Bromley-Brits, K., Deng, Y., Song, W., 2011. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J. Vis. Exp. JoVE.* <https://doi.org/10.3791/2920>
- Burkon, A., Somoza, V., 2008. Quantification of free and protein-bound trans-resveratrol metabolites and identification of trans-resveratrol-C/O-conjugated diglucuronides - two novel resveratrol metabolites in human plasma. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 549–557. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700290>
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E.J., Crozier, A., 2002. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3337–3340. <https://doi.org/10.1021/jf0112973>
- Butterfield, D.A., Lauderback, C.M., 2002. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1050–1060. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00794-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00794-3)

- Cacabelos, R., Takeda, M., Winblad, B., 1999. The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 14, 3–47. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1166\(199901\)14:1<3::aid-gps897>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1166(199901)14:1<3::aid-gps897>3.0.co;2-7)
- Caccamo, A., Oddo, S., Sugarman, M.C., Akbari, Y., LaFerla, F.M., 2005. Age- and region-dependent alterations in Aβ-degrading enzymes: implications for Aβ-induced disorders. *Neurobiol. Aging* 26, 645–654. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.06.013>
- Cai, Z., Qiao, P.-F., Wan, C.-Q., Cai, M., Zhou, N.-K., Li, Q., 2018. Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 63, 1223–1234. <https://doi.org/10.3233/JAD-180098>
- Caillaud, M., Guillard, J., Richard, D., Milin, S., Chassaing, D., Paccalin, M., Page, G., Rioux Bilan, A., 2019. Trans ε viniferin decreases amyloid deposits and inflammation in a mouse transgenic Alzheimer model. *PloS One* 14, e0212663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212663>
- Capiralla, H., Vingtdeux, V., Zhao, H., Sankowski, R., Al-Abed, Y., Davies, P., Marambaud, P., 2012. Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and Aβ-mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF-κB/STAT signaling cascade. *J. Neurochem.* 120, 461–472. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07594.x>
- Castegna, A., Lauderback, C.M., Mohmmad-Abdul, H., Butterfield, D.A., 2004. Modulation of phospholipid asymmetry in synaptosomal membranes by the lipid peroxidation products, 4-hydroxynonenal and acrolein: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1004, 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.01.036>
- Chen, G.-F., Xu, T.-H., Yan, Y., Zhou, Y.-R., Jiang, Y., Melcher, K., Xu, H.E., 2017. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol. Sin.* 38, 1205–1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>
- Chen, Y., Shi, G.-W., Liang, Z.-M., Sheng, S.-Y., Shi, Y.-S., Peng, L., Wang, Y.-P., Wang, F., Zhang, X.-M., 2019. Resveratrol improves cognition and decreases amyloid plaque formation in Tg6799 mice. *Mol. Med. Rep.* 19, 3783–3790. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10010>
- Cheng, D., Logge, W., Low, J.K., Garner, B., Karl, T., 2013. Novel behavioural characteristics of the APP(Swe)/PS1ΔE9 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.* 245, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.008>
- Cheng, J., Guo, X., Zhang, T., Zhong, L., Bu, G., Chen, X., 2016. TREMs in Alzheimer's disease: Genetic and clinical investigations. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 463, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.10.022>
- Cho, H.J., Kim, S.-K., Jin, S.M., Hwang, E.-M., Kim, Y.S., Huh, K., Mook-Jung, I., 2007. IFN-γ-induced BACE1 expression is mediated by activation of JAK2 and ERK1/2 signaling pathways and direct binding of STAT1 to BACE1 promoter in astrocytes. *Glia* 55, 253–262. <https://doi.org/10.1002/glia.20451>
- Cirrito, J.R., Deane, R., Fagan, A.M., Spinner, M.L., Parsadanian, M., Finn, M.B., Jiang, H., Prior, J.L., Sagare, A., Bales, K.R., Paul, S.M., Zlokovic, B.V., Pivnicka-Worms, D., Holtzman, D.M., 2005. P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* 115, 3285–3290. <https://doi.org/10.1172/JCI25247>

- Ciudad, S., Puig, E., Botzanowski, T., Meigooni, M., Arango, A.S., Do, J., Mayzel, M., Bayoumi, M., Chaignepain, S., Maglia, G., Cianferani, S., Orekhov, V., Tajkhorshid, E., Bardiaux, B., Carulla, N., 2020. A β (1-42) tetramer and octamer structures reveal edge conductivity pores as a mechanism for membrane damage. *Nat. Commun.* 11, 3014. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16566-1>
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., Tolnay, M., 2009. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat. Cell Biol.* 11, 909–913. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>
- Clériveret, A., Alami, I., Breton, F., Garcia, D., Sanier, C., 1996. Les composés phénoliques et la résistance des plantes aux agents pathogènes. *Acta Bot. Gallica* 143, 531–538. <https://doi.org/10.1080/12538078.1996.10515350>
- Conlon, R.A., Reaume, A.G., Rossant, J., 1995. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Dev. Camb. Engl.* 121, 1533–1545.
- Coraci, I.S., Husemann, J., Berman, J.W., Hulette, C., Dufour, J.H., Campanella, G.K., Luster, A.D., Silverstein, S.C., El-Khoury, J.B., 2002. CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am. J. Pathol.* 160, 101–112. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64354-4](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64354-4)
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923. <https://doi.org/10.1126/science.8346443>
- Cox, C.J., Choudhry, F., Peacey, E., Perkinson, M.S., Richardson, J.C., Howlett, D.R., Lichtenthaler, S.F., Francis, P.T., Williams, R.J., 2015. Dietary (–)-epicatechin as a potent inhibitor of $\beta\gamma$ -secretase amyloid precursor protein processing. *Neurobiol. Aging* 36, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.032>
- Dangles, O., 2012. Antioxidant Activity of Plant Phenols: Chemical Mechanisms and Biological Significance. *Curr. Org. Chem.* 16, 692–714. <https://doi.org/10.2174/138527212799957995>
- De Calignon, A., Polydoro, M., Suárez-Calvet, M., William, C., Adamowicz, D.H., Kopeikina, K.J., Pitstick, R., Sahara, N., Ashe, K.H., Carlson, G.A., Spires-Jones, T.L., Hyman, B.T., 2012. Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron* 73, 685–697. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.033>
- Deane, R., Du Yan, S., Subramanian, R.K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., Zhu, H., Ghiso, J., Frangione, B., Stern, A., Schmidt, A.M., Armstrong, D.L., Arnold, B., Liliensiek, B., Nawroth, P., Hofman, F., Kindy, M., Stern, D., Zlokovic, B., 2003. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat. Med.* 9, 907–913. <https://doi.org/10.1038/nm890>
- Deane, R., Wu, Z., Sagare, A., Davis, J., Du Yan, S., Hamm, K., Xu, F., Parisi, M., LaRue, B., Hu, H.W., Spijkers, P., Guo, H., Song, X., Lenting, P.J., Van Nostrand, W.E., Zlokovic, B.V., 2004. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of A β isoforms. *Neuron* 43, 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.017>

- DeKosky, S.T., Scheff, S.W., 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* 27, 457–464. <https://doi.org/10.1002/ana.410270502>
- Del Sole, A., Clerici, F., Chiti, A., Lecchi, M., Mariani, C., Maggiore, L., Mosconi, L., Lucignani, G., 2008. Individual cerebral metabolic deficits in Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment: an FDG PET study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35, 1357–1366. <https://doi.org/10.1007/s00259-008-0773-6>
- D'Hooge, R., De Deyn, P.P., 2001. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36, 60–90. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(01\)00067-4](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(01)00067-4)
- Dickinson, B.C., Chang, C.J., 2011. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.* 7, 504–511. <https://doi.org/10.1038/nchembio.607>
- Dietz, C., Dekker, M., 2017. Effect of Green Tea Phytochemicals on Mood and Cognition. *Curr. Pharm. Des.* 23, 2876–2905. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170105151800>
- Donahue, J.E., Flaherty, S.L., Johanson, C.E., Duncan, J.A., Silverberg, G.D., Miller, M.C., Tavares, R., Yang, W., Wu, Q., Sabo, E., Hovanesian, V., Stopa, E.G., 2006. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 112, 405–415. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0115-3>
- Drachman, D.A., Leavitt, J., 1974. Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch. Neurol.* 30, 113–121. <https://doi.org/10.1001/archneur.1974.00490320001001>
- Dubois, B., 2019. Alzheimer: la vérité sur la maladie du siècle. Grasset, Paris.
- 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., Pasquier, F., Rabinovici, G., Robert, P., Rowe, C., Salloway, S., Sarazin, M., Epelbaum, S., de Souza, L.C., Vellas, B., Visser, P.J., Schneider, L., Stern, Y., Scheltens, P., Cummings, J.L., 2014. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* 13, 614–629. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70090-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70090-0)
- Dubois, B., Touchon, J., Portet, F., Vellas, B., Michel, B., 2002. “Les 5 mots”, épreuve simple et sensible pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer 4.
- Dyck, G.J.B., Raj, P., Zieroth, S., Dyck, J.R.B., Ezekowitz, J.A., 2019. The Effects of Resveratrol in Patients with Cardiovascular Disease and Heart Failure: A Narrative Review. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20040904>
- El Khoury, J., Luster, A.D., 2008. Mechanisms of microglia accumulation in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 626–632. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.08.004>
- Esposito, Z., Belli, L., Toniolo, S., Sancesario, G., Bianconi, C., Martorana, A., 2013. Amyloid β , glutamate, excitotoxicity in Alzheimer's disease: are we on the right track? *CNS Neurosci. Ther.* 19, 549–555. <https://doi.org/10.1111/cns.12095>
- Evin, G., Barakat, A., Masters, C.L., 2010. BACE: Therapeutic target and potential biomarker for Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1923–1926. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.08.017>

- Fang, F., Lue, L.-F., Yan, Shiqiang, Xu, H., Luddy, J.S., Chen, D., Walker, D.G., Stern, D.M., Yan, Shifang, Schmidt, A.M., Chen, J.X., Yan, S.S., 2010. RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24, 1043–1055. <https://doi.org/10.1096/fj.09-139634>
- Farmery, M.R., Tjernberg, L.O., Pursglove, S.E., Bergman, A., Winblad, B., Näslund, J., 2003. Partial purification and characterization of gamma-secretase from post-mortem human brain. *J. Biol. Chem.* 278, 24277–24284. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211992200>
- Favier, A., 2003. Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique - L'Actualité Chimique [WWW Document]. URL <https://www.lactualitechimique.org/Le-stress-oxydant-interet-conceptuel-et-experimental-dans-la-comprehension-des-mecanismes-des> (accessed 4.20.20).
- Feng, L., Zhang, L., 2019. Resveratrol Suppresses A β -Induced Microglial Activation Through the TXNIP/TRX/NLRP3 Signaling Pathway. *DNA Cell Biol.* 38, 874–879. <https://doi.org/10.1089/dna.2018.4308>
- Findley, C.A., Bartke, A., Hascup, K.N., Hascup, E.R., 2019. Amyloid Beta-Related Alterations to Glutamate Signaling Dynamics During Alzheimer's Disease Progression. *ASN Neuro* 11, 1759091419855541. <https://doi.org/10.1177/1759091419855541>
- Frackowiak, J., Zoltowska, A., Wisniewski, H.M., 1994. Non-fibrillar beta-amyloid protein is associated with smooth muscle cells of vessel walls in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 637–645. <https://doi.org/10.1097/00005072-199411000-00011>
- Freyssin, A., Page, G., Fauconneau, B., Rioux Bilan, A., 2020. Natural stilbenes effects in animal models of Alzheimer's disease. *Neural Regen. Res.* 15, 843–849. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.268970>
- Freyssin, A., Page, G., Fauconneau, B., Rioux Bilan, A., 2018. Natural polyphenols effects on protein aggregates in Alzheimer's and Parkinson's prion-like diseases. *Neural Regen. Res.* 13, 955–961. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.233432>
- Frost, B., Jacks, R.L., Diamond, M.I., 2009. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J. Biol. Chem.* 284, 12845–12852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>
- Fukumoto, H., Cheung, B.S., Hyman, B.T., Irizarry, M.C., 2002. Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 59, 1381–1389. <https://doi.org/10.1001/archneur.59.9.1381>
- Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K.M., Gomez-Cabrera, M.C., Vina, J., Borrás, C., 2015. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/837042>
- Garcia-Alloza, M., Robbins, E.M., Zhang-Nunes, S.X., Purcell, S.M., Betensky, R.A., Raju, S., Prada, C., Greenberg, S.M., Bacskai, B.J., Frosch, M.P., 2006. Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* 24, 516–524. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.08.017>
- Gescher, A.J., Steward, W.P., 2003. Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidemiol.*

- Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol. 12, 953–957.
- Ghedira, K., 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie* 3, 162–169. <https://doi.org/10.1007/s10298-005-0096-8>
- Glenner, G.G., Wong, C.W., 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. 1984. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, 534–539. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.020>
- Glorieux, C., Calderon, P.B., 2017. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol. Chem.* 398, 1095–1108. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>
- 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, 704–706. <https://doi.org/10.1038/349704a0>
- Goetz, C.G., 2011. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a008862. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008862>
- Goldberg, D.M., Yan, J., Soleas, G.J., 2003. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin. Biochem.* 36, 79–87. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(02\)00397-1](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(02)00397-1)
- Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, W.O., Saffiotti, U., Gajdusek, D.C., 1987. Isolation, characterization, and chromosomal localization of human brain cDNA clones coding for the precursor of the amyloid of brain in Alzheimer's disease, Down's syndrome and aging. *J. Neural Transm. Suppl.* 24, 23–28.
- Gouras, G.K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J.P., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Xu, H., Greengard, P., Relkin, N.R., 2000. Intraneuronal A β 42 Accumulation in Human Brain. *Am. J. Pathol.* 156, 15–20.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., Binder, L.I., 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4913–4917. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.13.4913>
- Grundke-Iqbal, I., Johnson, A.B., Wisniewski, H.M., Terry, R.D., Iqbal, K., 1979. Evidence that Alzheimer neurofibrillary tangles originate from neurotubules. *Lancet Lond. Engl.* 1, 578–580. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(79\)91006-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(79)91006-7)
- Gu, Y.-Z., Chu, X., Houle, R., Vlasakova, K., Koeplinger, K.A., Bourgeois, I., Palyada, K., Anderson, K.D., Brynczka, C., Bhatt, B., Chen, F., Smith, R., Amin, R., Glaab, W.E., Lebron, J., Cox, K., Sistare, F.D., 2019. Polyethylene Glycol 200 Can Protect Rats Against Drug-Induced Kidney Toxicity Through Inhibition of the Renal Organic Anion Transporter 3. *Toxicol. Sci.* 172, 155–166. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz186>
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J.S.K., Younkin, S., Hazrati, L., Collinge, J., Pocock, J., Lashley, T., Williams, J., Lambert, J.-C., Amouyel, P., Goate, A., Rademakers, R., Morgan, K., Powell, J., St. George-Hyslop, P., Singleton, A., Hardy, J., 2013. TREM2 Variants in Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 117–127. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211851>

- Guo, Q., Fu, W., Sopher, B.L., Miller, M.W., Ware, C.B., Martin, G.M., Mattson, M.P., 1999. Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nat. Med.* 5, 101–106. <https://doi.org/10.1038/4789>
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., Sisodia, S., 2012. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006270. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>
- Haass, C., Lemere, C.A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., Selkoe, D.J., 1995. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat. Med.* 1, 1291–1296. <https://doi.org/10.1038/nm1295-1291>
- Han, M.-R., Schellenberg, G.D., Wang, L.-S., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2010. Genome-wide association reveals genetic effects on human A β 42 and τ protein levels in cerebrospinal fluids: a case control study. *BMC Neurol.* 10, 90. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-10-90>
- Hansen, D.V., Hanson, J.E., Sheng, M., 2018. Microglia in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* 217, 459–472. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709069>
- Hardy, J., Allsop, D., 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 383–388. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90609-v](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90609-v)
- Hardy, J., Duff, K., Hardy, K.G., Perez-Tur, J., Hutton, M., 1998. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat. Neurosci.* 1, 355–358. <https://doi.org/10.1038/1565>
- Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
- Hartlage-Rübsamen, M., Zeitschel, U., Apelt, J., Gärtner, U., Franke, H., Stahl, T., Günther, A., Schliebs, R., Penkowa, M., Bigl, V., Rossner, S., 2003. Astrocytic expression of the Alzheimer's disease beta-secretase (BACE1) is stimulus-dependent. *Glia* 41, 169–179. <https://doi.org/10.1002/glia.10178>
- Hauw, J.J., Duyckaerts, C., Delaère, P., Lamy, C., 1991. [Alzheimer's disease: from neuropathology to symptoms]. *Rev. Prat.* 41, 1188–1194.
- Hayden, E.Y., Teplow, D.B., 2013. Amyloid β -protein oligomers and Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 5, 60. <https://doi.org/10.1186/alzrt226>
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., Ma, X., 2017. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 44, 532–553. <https://doi.org/10.1159/000485089>
- Henjum, K., Almdahl, I.S., Årskog, V., Minthon, L., Hansson, O., Fladby, T., Nilsson, L.N.G., 2016. Cerebrospinal fluid soluble TREM2 in aging and Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 8. <https://doi.org/10.1186/s13195-016-0182-1>
- Heppner, F.L., Ransohoff, R.M., Becher, B., 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 358–372. <https://doi.org/10.1038/nrn3880>
- Hernandez-Saavedra, D., McCord, J.M., 2003. Paradoxical effects of thiol reagents on Jurkat cells and a new thiol-sensitive mutant form of human mitochondrial superoxide dismutase. *Cancer Res.* 63, 159–163.

- Hersi, M., Irvine, B., Gupta, P., Gomes, J., Birkett, N., Krewski, D., 2017. Risk factors associated with the onset and progression of Alzheimer's disease: A systematic review of the evidence. *Neurotoxicology* 61, 143–187. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.03.006>
- Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., El Khoury, J., 2018. Microglia in neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* 21, 1359–1369. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>
- Ho, L., Yemul, S., Wang, J., Pasinetti, G.M., 2009. Grape seed polyphenolic extract as a potential novel therapeutic agent in tauopathies. *J. Alzheimers Dis. JAD* 16, 433–439. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-0969>
- Hommet, C., Mondon, K., Camus, V., Ribeiro, M.J., Beaufils, E., Arlicot, N., Corcia, P., Paccalin, M., Minier, F., Gosselin, T., Page, G., Guilloteau, D., Chalon, S., 2014. Neuroinflammation and β Amyloid Deposition in Alzheimer's Disease: In vivo Quantification with Molecular Imaging. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 37, 1–18. <https://doi.org/10.1159/000354363>
- Hong, H.S., Hwang, E.M., Sim, H.J., Cho, H.-J., Boo, J.H., Oh, S.S., Kim, S.U., Mook-Jung, I., 2003. Interferon gamma stimulates beta-secretase expression and sAPPbeta production in astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 922–927. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01270-1](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01270-1)
- Hu, J., Lin, T., Gao, Y., Xu, J., Jiang, C., Wang, G., Bu, G., Xu, H., Chen, H., Zhang, Y., 2015. The resveratrol trimer miyabenol C inhibits β -secretase activity and β -amyloid generation. *PloS One* 10, e0115973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115973>
- Huang, P., Zheng, N., Zhou, H.-B., Huang, J., 2020. Curcumin inhibits BACE1 expression through the interaction between ER β and NF κ B signaling pathway in SH-SY5Y cells. *Mol. Cell. Biochem.* 463, 161–173. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03638-0>
- Hümmer, W., Schreier, P., 2008. Analysis of proanthocyanidins. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 1381–1398. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700463>
- Hung, S.-Y., Fu, W.-M., 2017. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J. Biomed. Sci.* 24, 47. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0355-7>
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M.C.B., Rahu, N., 2016. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 7432797. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
- Ingelsson, M., Fukumoto, H., Newell, K.L., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Frosch, M.P., Albert, M.S., Hyman, B.T., Irizarry, M.C., 2004. Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* 62, 925–931. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000115115.98960.37>
- Iqbal, K., Tellez-Nagel, I., 1972. Isolation of neurons and glial cells from normal and pathological human brains. *Brain Res.* 45, 296–301. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90241-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90241-7)
- Iqbal, K., Wiśniewski, H.M., Shelanski, M.L., Brostoff, S., Liwnicz, B.H., Terry, R.D., 1974. Protein changes in senile dementia. *Brain Res.* 77, 337–343. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90798-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(74)90798-7)
- Iwata, N., Mizukami, H., Shirotani, K., Takaki, Y., Muramatsu, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Ozawa, K., Saido, T.C., 2004. Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 991–998. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4792-03.2004>

- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H.J., Saido, T.C., 2001. Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292, 1550–1552. <https://doi.org/10.1126/science.1059946>
- Jacob, C.P., Koutsilieris, E., Bartl, J., Neuen-Jacob, E., Arzberger, T., Zander, N., Ravid, R., Roggendorf, W., Riederer, P., Grünblatt, E., 2007. Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 11, 97–116. <https://doi.org/10.3233/jad-2007-11113>
- Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Borchelt, D.R., 2004. APP processing and amyloid deposition in mice haplo-insufficient for presenilin 1. *Neurobiol. Aging* 25, 885–892. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.09.008>
- Javadi, F., Ahmadzadeh, A., Eghtesadi, S., Aryaeian, N., Zabihyeganeh, M., Rahimi Ferooshani, A., Jazayeri, S., 2017. The Effect of Quercetin on Inflammatory Factors and Clinical Symptoms in Women with Rheumatoid Arthritis: A Double-Blind, Randomized Controlled Trial. *J. Am. Coll. Nutr.* 36, 9–15. <https://doi.org/10.1080/07315724.2016.1140093>
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., Adrian, M., 2002. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2731–2741. <https://doi.org/10.1021/jf011429s>
- Jeynes, B., Provias, J., 2008. Evidence for altered LRP/RAGE expression in Alzheimer lesion pathogenesis. *Curr. Alzheimer Res.* 5, 432–437. <https://doi.org/10.2174/156720508785908937>
- Jiang, H., Jayadev, S., Lardelli, M., Newman, M., 2018. A Review of the Familial Alzheimer's Disease Locus PRESENILIN 2 and Its Relationship to PRESENILIN 1. *J. Alzheimers Dis. JAD* 66, 1323–1339. <https://doi.org/10.3233/JAD-180656>
- Jiménez-Aliaga, K., Bermejo-Bescós, P., Benedí, J., Martín-Aragón, S., 2011. Quercetin and rutin exhibit anti-amyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APP^{swe} cells. *Life Sci.* 89, 939–945. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.09.023>
- Jin, M., Shepardson, N., Yang, T., Chen, G., Walsh, D., Selkoe, D.J., 2011. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5819–5824. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017033108>
- Justesen, U., Knuthsen, P., Leth, T., 1998. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 799, 101–110. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01061-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01061-3)
- Kamat, P.K., Kalani, A., Rai, S., Swarnkar, S., Tota, S., Nath, C., Tyagi, N., 2016. Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies. *Mol. Neurobiol.* 53, 648–661. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9053-6>
- Karch, C.M., Jeng, A.T., Nowotny, P., Cady, J., Cruchaga, C., Goate, A.M., 2012. Expression of novel Alzheimer's disease risk genes in control and Alzheimer's disease brains. *PLoS One* 7, e50976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050976>

- Katzman, R., 1976. Editorial: The prevalence and malignancy of Alzheimer disease. A major killer. *Arch. Neurol.* 33, 217–218. <https://doi.org/10.1001/archneur.1976.00500040001001>
- Kidd, M., 1963. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197, 192–193. <https://doi.org/10.1038/197192b0>
- Kimura, T., Ono, T., Takamatsu, J., Yamamoto, H., Ikegami, K., Kondo, A., Hasegawa, M., Ihara, Y., Miyamoto, E., Miyakawa, T., 1996. Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dement. Basel Switz.* 7, 177–181. <https://doi.org/10.1159/000106875>
- King, A., 2018. The search for better animal models of Alzheimer's disease. *Nature* 559, S13–S15. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05722-9>
- Kishi, T., Matsunaga, S., Oya, K., Nomura, I., Ikuta, T., Iwata, N., 2017. Memantine for Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *J. Alzheimers Dis. JAD* 60, 401–425. <https://doi.org/10.3233/JAD-170424>
- Kitazume, S., Tachida, Y., Kato, M., Yamaguchi, Y., Honda, T., Hashimoto, Y., Wada, Y., Saito, T., Iwata, N., Saido, T., Taniguchi, N., 2010. Brain endothelial cells produce amyloid {beta} from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form. *J. Biol. Chem.* 285, 40097–40103. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.144626>
- Korte, M., Herrmann, U., Zhang, X., Draguhn, A., 2012. The role of APP and APLP for synaptic transmission, plasticity, and network function: lessons from genetic mouse models. *Exp. Brain Res.* 217, 435–440. <https://doi.org/10.1007/s00221-011-2894-6>
- Kosik, K.S., Joachim, C.L., Selkoe, D.J., 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4044–4048. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.11.4044>
- Kurochkin, I.V., Guarnera, E., Berezovsky, I.N., 2018. Insulin-Degrading Enzyme in the Fight against Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 39, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.10.008>
- Lacor, P.N., Buniel, M.C., Furlow, P.W., Clemente, A.S., Velasco, P.T., Wood, M., Viola, K.L., Klein, W.L., 2007. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 796–807. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3501-06.2007>
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L., 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6448–6453. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6448>
- Laumet, G., 2010. Rôle des ADAM dans le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer.
- Lee, Goh, M.Q.L., Koo, E.H., 2017a. Transcriptional regulation of APP by apoE: To boldly go where no isoform has gone before: ApoE, APP transcription and AD: Hypothesised mechanisms and existing knowledge gaps. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 39. <https://doi.org/10.1002/bies.201700062>

- Lee, M.K., Slunt, H.H., Martin, L.J., Thinakaran, G., Kim, G., Gandy, S.E., Seeger, M., Koo, E., Price, D.L., Sisodia, S.S., 1996. Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 7513–7525.
- Lee, Nam, E., Lee, H.J., Savelieff, M.G., Lim, M.H., 2017b. Towards an understanding of amyloid- β oligomers: characterization, toxicity mechanisms, and inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* 46, 310–323. <https://doi.org/10.1039/c6cs00731g>
- Lee, Torosyan, N., Silverman, D.H., 2017c. Examining the impact of grape consumption on brain metabolism and cognitive function in patients with mild decline in cognition: A double-blinded placebo controlled pilot study. *Exp. Gerontol.* 87, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.10.004>
- Lesné, S.E., Sherman, M.A., Grant, M., Kuskowski, M., Schneider, J.A., Bennett, D.A., Ashe, K.H., 2013. Brain amyloid- β oligomers in ageing and Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* 136, 1383–1398. <https://doi.org/10.1093/brain/awt062>
- Li, H.-W., Zhang, L., Qin, C., 2019. Current state of research on non-human primate models of Alzheimer's disease. *Anim. Models Exp. Med.* 2, 227–238. <https://doi.org/10.1002/ame2.12092>
- Li, S., Mallory, M., Alford, M., Tanaka, S., Masliah, E., 1997. Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 901–911. <https://doi.org/10.1097/00005072-199708000-00008>
- Li, T., Wen, H., Brayton, C., Laird, F.M., Ma, G., Peng, S., Placanica, L., Wu, T.C., Crain, B.J., Price, D.L., Eberhart, C.G., Wong, P.C., 2007. Moderate reduction of gamma-secretase attenuates amyloid burden and limits mechanism-based liabilities. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 10849–10859. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2152-07.2007>
- Lue, L.F., Rydel, R., Brigham, E.F., Yang, L.B., Hampel, H., Murphy, G.M., Brachova, L., Yan, S.D., Walker, D.G., Shen, Y., Rogers, J., 2001. Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia* 35, 72–79. <https://doi.org/10.1002/glia.1072>
- Luo, G., Xu, H., Huang, Y., Mo, D., Song, L., Jia, B., Wang, B., Jin, Z., Miao, Z., 2016. Deposition of BACE-1 Protein in the Brains of APP/PS1 Double Transgenic Mice. *BioMed Res. Int.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8380618>
- Maeda, J., Ji, B., Irie, T., Tomiyama, T., Maruyama, M., Okauchi, T., Staufenbiel, M., Iwata, N., Ono, M., Saido, T.C., Suzuki, K., Mori, H., Higuchi, M., Suhara, T., 2007. Longitudinal, Quantitative Assessment of Amyloid, Neuroinflammation, and Anti-Amyloid Treatment in a Living Mouse Model of Alzheimer's Disease Enabled by Positron Emission Tomography. *J. Neurosci.* 27, 10957–10968. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0673-07.2007>
- Mähler, A., Steiniger, J., Bock, M., Klug, L., Parreidt, N., Lorenz, M., Zimmermann, B.F., Krannich, A., Paul, F., Boschmann, M., 2015. Metabolic response to epigallocatechin-3-gallate in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomized clinical trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 101, 487–495. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.075309>
- Maleki, S.J., Crespo, J.F., Cabanillas, B., 2019. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chem.* 299, 125124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125124>
- Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., Reddy, P.H., 2006. Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for

- free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1437–1449. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl066>
- Marambaud, P., Zhao, H., Davies, P., 2005. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J. Biol. Chem.* 280, 37377–37382. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508246200>
- Marchal, S., Givalois, L., Verdier, J.M., Mestre-Francés, N., 2012. Distribution of lithostathine in the mouse lemur brain with aging and Alzheimer's-like pathology. *Neurobiol. Aging* 33, 431.e15–25. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.01.002>
- Marighetto, A., Etchamendy, N., Touzani, K., Torrea, C.C., Yee, B.K., Rawlins, J.N., Jaffard, R., 1999. Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3312–3322. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00741.x>
- Markesbery, W.R., 1997. Neuropathological Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Aging* 18, S13–S19. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(97\)00064-X](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(97)00064-X)
- Markiewicz, I., Lukomska, B., 2006. The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 66, 343–358.
- Marranzano, M., Rosa, R.L., Malaguarnera, M., Palmeri, R., Tessitori, M., Barbera, A.C., 2018. Polyphenols: Plant Sources and Food Industry Applications. *Curr. Pharm. Des.* 24, 4125–4130. <https://doi.org/10.2174/1381612824666181106091303>
- Martín-Aragón, S., Jiménez-Aliaga, K.L., Benedí, J., Bermejo-Bescós, P., 2016. Neurohormetic responses of quercetin and rutin in a cell line over-expressing the amyloid precursor protein (APP^{swe} cells). *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 23, 1285–1294. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.07.007>
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., Beyreuther, K., 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4245–4249. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.4245>
- McClung, H.J., Sloan, H.R., Powers, P., Merola, A.J., Murray, R., Kerzner, B., Pollack, J.D., 1990. Early changes in the permeability of the blood-brain barrier produced by toxins associated with liver failure. *Pediatr. Res.* 28, 227–231. <https://doi.org/10.1203/00006450-199009000-00014>
- McShane, R., Areosa Sastre, A., Minakaran, N., 2006. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003154. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003154.pub5>
- Meissner, W., Prunier, C., Guilloteau, D., Chalon, S., Gross, C.E., Bezard, E., 2003. Time-course of nigrostriatal degeneration in a progressive MPTP-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *Mol. Neurobiol.* 28, 209–218. <https://doi.org/10.1385/MN:28:3:209>
- Mi, K., Johnson, G.V.W., 2006. The role of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 3, 449–463. <https://doi.org/10.2174/156720506779025279>
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52, 673–751.
- Mielgo-Ayuso, J., Barrenechea, L., Alcorta, P., Larrarte, E., Margareto, J., Labayen, I., 2014. Effects of dietary supplementation with epigallocatechin-3-gallate on weight loss, energy homeostasis, cardiometabolic risk factors and liver function in obese women: randomised,

- double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Br. J. Nutr.* 111, 1263–1271. <https://doi.org/10.1017/S0007114513003784>
- Minett, T., Classey, J., Matthews, F.E., Fahrenhold, M., Taga, M., Brayne, C., Ince, P.G., Nicoll, J.A.R., Boche, D., 2016. Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology. *J. Neuroinflammation* 13. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0601-z>
- Montagne, A., Zhao, Z., Zlokovic, B.V., 2017. Alzheimer's disease: A matter of blood-brain barrier dysfunction? *J. Exp. Med.* 214, 3151–3169. <https://doi.org/10.1084/jem.20171406>
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Watanabe, A., Titani, K., Ihara, Y., 1995. Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol. Aging* 16, 365–371; discussion 371-380. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)00027-c](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)00027-c)
- Morris, R.G.M., Garrud, P., Rawlins, J.N.P., O'Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683. <https://doi.org/10.1038/297681a0>
- Moussa, C.E.-H., 2017. Beta-secretase inhibitors in phase I and phase II clinical trials for Alzheimer's disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* 26, 1131–1136. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1369527>
- Mroczo, B., Groblewska, M., Litman-Zawadzka, A., Kornhuber, J., Lewczuk, P., 2018. Amyloid β oligomers (A β Os) in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 125, 177–191. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1820-x>
- Müller, U., Winter, P., Graeber, M.B., 2013. A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 12, 129–130. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70307-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70307-1)
- Nakajima, K., Kohsaka, S., 2001. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J. Biochem. (Tokyo)* 130, 169–175. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002969>
- Nalivaeva, N.N., Turner, A.J., 2013. The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett.* 587, 2046–2054. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.010>
- Naseri, N.N., Wang, H., Guo, J., Sharma, M., Luo, W., 2019. The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 705, 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.04.022>
- Newcombe, E.A., Camats-Perna, J., Silva, M.L., Valmas, N., Huat, T.J., Medeiros, R., 2018. Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 15, 276. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1313-3>
- Nicolas, C., Tauber, C., Lepelletier, F.-X., Chalon, S., Belujon, P., Galineau, L., Solinas, M., 2017. Longitudinal Changes in Brain Metabolic Activity after Withdrawal from Escalation of Cocaine Self-Administration. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 42, 1981–1990. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.109>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>
- O'Brien, R.J., Wong, P.C., 2011. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 185–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>

- Ohara, K., Kusano, K., Kitao, S., Yanai, T., Takata, R., Kanauchi, O., 2015. ϵ -Viniferin, a resveratrol dimer, prevents diet-induced obesity in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 468, 877–882. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.047>
- O’Keefe, J., Conway, D.H., 1978. Hippocampal place units in the freely moving rat: Why they fire where they fire. *Exp. Brain Res.* 31, 573–590. <https://doi.org/10.1007/BF00239813>
- Oulès, B., Del Prete, D., Greco, B., Zhang, X., Lauritzen, I., Sevalle, J., Moreno, S., Paterlini-Bréchet, P., Trebak, M., Checler, F., Benfenati, F., Chami, M., 2012. Ryanodine Receptor Blockade Reduces Amyloid- β Load and Memory Impairments in Tg2576 Mouse Model of Alzheimer Disease. *J. Neurosci.* 32, 11820–11834. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0875-12.2012>
- Parhiz, H., Roohbakhsh, A., Soltani, F., Rezaee, R., Iranshahi, M., 2015. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytother. Res. PTR* 29, 323–331. <https://doi.org/10.1002/ptr.5256>
- Pekny, M., Nilsson, M., 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427–434. <https://doi.org/10.1002/glia.20207>
- Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., Scalbert, A., 2010. Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4959–4969. <https://doi.org/10.1021/jf100128b>
- Peskind, E.R., Potkin, S.G., Pomara, N., Ott, B.R., Graham, S.M., Olin, J.T., McDonald, S., 2006. Memantine treatment in mild to moderate Alzheimer disease: a 24-week randomized, controlled trial. *Am. J. Geriatr. Psychiatry Off. J. Am. Assoc. Geriatr. Psychiatry* 14, 704–715. <https://doi.org/10.1097/01.JGP.0000224350.82719.83>
- Peterson, J., Dwyer, J., 1998. Taxonomic classification helps identify flavonoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire. *J. Am. Diet. Assoc.* 98, 677–682, 685; quiz 683–684. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(98\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(98)00153-9)
- Pham, E., Crews, L., Ubhi, K., Hansen, L., Adame, A., Cartier, A., Salmon, D., Galasko, D., Michael, S., Savas, J.N., Yates, J.R., Glabe, C., Masliah, E., 2010. Progressive accumulation of amyloid-beta oligomers in Alzheimer’s disease and in amyloid precursor protein transgenic mice is accompanied by selective alterations in synaptic scaffold proteins. *FEBS J.* 277, 3051–3067. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07719.x>
- Pickett, E.K., Koffie, R.M., Wegmann, S., Henstridge, C.M., Herrmann, A.G., Colom-Cadena, M., Lleo, A., Kay, K.R., Vaught, M., Soberman, R., Walsh, D.M., Hyman, B.T., Spire-Jones, T.L., 2016. Non-Fibrillar Oligomeric Amyloid- β within Synapses. *J. Alzheimers Dis. JAD* 53, 787–800. <https://doi.org/10.3233/JAD-160007>
- Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Foss, D., Mahley, R.W., 1987. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 917, 148–161. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(87\)90295-5](https://doi.org/10.1016/0005-2760(87)90295-5)
- Piver, B., Berthou, F., Dreano, Y., Lucas, D., 2003. Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by epsilon-viniferin, the dimer of resveratrol: comparison with resveratrol and polyphenols from alcoholized beverages. *Life Sci.* 73, 1199–1213. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00420-x](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00420-x)
- Poisnel, G., Dhilly, M., Moustié, O., Delamare, J., Abbas, A., Guilloteau, D., Barré, L., 2012. PET imaging with [18F]AV-45 in an APP/PS1-21 murine model of amyloid plaque deposition. *Neurobiol. Aging* 33, 2561–2571. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.12.024>

- Porquet, D., Casadesús, G., Bayod, S., Vicente, A., Canudas, A.M., Vilaplana, J., Pelegrí, C., Sanfeliu, C., Camins, A., Pallàs, M., del Valle, J., 2013. Dietary resveratrol prevents Alzheimer's markers and increases life span in SAMP8. *Age Dordr. Neth.* 35, 1851–1865. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9489-4>
- Porquet, D., Griñán-Ferré, C., Ferrer, I., Camins, A., Sanfeliu, C., Del Valle, J., Pallàs, M., 2014. Neuroprotective role of trans-resveratrol in a murine model of familial Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 42, 1209–1220. <https://doi.org/10.3233/JAD-140444>
- Prox, J., Bernreuther, C., Altmepfen, H., Grendel, J., Glatzel, M., D'Hooge, R., Stroobants, S., Ahmed, T., Balschun, D., Willem, M., Lammich, S., Isbrandt, D., Schweizer, M., Horrè, K., De Strooper, B., Saftig, P., 2013. Postnatal disruption of the disintegrin/metalloproteinase ADAM10 in brain causes epileptic seizures, learning deficits, altered spine morphology, and defective synaptic functions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 12915–12928, 12928a. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5910-12.2013>
- Prusiner, S.B., 1994. Neurodegeneration in humans caused by prions. *West. J. Med.* 161, 264–272.
- Raha, A.A., Henderson, J.W., Stott, S.R.W., Vuono, R., Foscarin, S., Friedland, R.P., Zaman, S.H., Raha-Chowdhury, R., 2017. Neuroprotective Effect of TREM-2 in Aging and Alzheimer's Disease Model. *J. Alzheimers Dis. JAD* 55, 199–217. <https://doi.org/10.3233/JAD-160663>
- Rajmohan, R., Reddy, P.H., 2017. Amyloid-Beta and Phosphorylated Tau Accumulations Cause Abnormalities at Synapses of Alzheimer's disease Neurons. *J. Alzheimers Dis. JAD* 57, 975–999. <https://doi.org/10.3233/JAD-160612>
- Reddy, P.H., Beal, M.F., 2008. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* 14, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.12.002>
- Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., Möbius, H.J., Memantine Study Group, 2003. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 348, 1333–1341. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa013128>
- Reiss, A.B., Arain, H.A., Stecker, M.M., Siegart, N.M., Kasselmann, L.J., 2018. Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* 29, 613–627. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0063>
- Ren, S., Liu, Z.-H., Wu, Q., Fu, K., Wu, J., Hou, L.-T., Li, M., Zhao, X., Miao, Q., Zhao, Y.-L., Wang, S.-Y., Xue, Y., Xue, Z., Guo, Y.-S., Canavero, S., Ren, X.-P., 2017. Polyethylene glycol-induced motor recovery after total spinal transection in rats. *CNS Neurosci. Ther.* 23, 680–685. <https://doi.org/10.1111/cns.12713>
- Renaud, S., de Lorgeril, M., 1993. The French paradox: dietary factors and cigarette smoking-related health risks. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 686, 299–309. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb39191.x>
- Renaud, S., de Lorgeril, M., Delaye, J., Guidollet, J., Jacquard, F., Mamelle, N., Martin, J.L., Monjaud, I., Salen, P., Toubol, P., 1995. Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 1360S-1367S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/61.6.1360S>
- Rezvan, N., Moini, A., Janani, L., Mohammad, K., Saedisomeolia, A., Nourbakhsh, M., Gorgani-Firuzjaee, S., Mazaherioun, M., Hosseinzadeh-Attar, M.J., 2017. Effects of Quercetin on Adiponectin-Mediated Insulin Sensitivity in Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized

- Placebo-Controlled Double-Blind Clinical Trial. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* 49, 115–121. <https://doi.org/10.1055/s-0042-118705>
- Ricciarelli, R., Fedele, E., 2017. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr. Neuropharmacol.* 15, 926–935. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170116143743>
- Richard, T., Poupard, P., Nassra, M., Papastamoulis, Y., Iglésias, M.-L., Krisa, S., Waffo-Teguo, P., Mérillon, J.-M., Monti, J.-P., 2011. Protective effect of ϵ -viniferin on β -amyloid peptide aggregation investigated by electrospray ionization mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 3152–3155. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.04.001>
- Ringman, J.M., Goate, A., Masters, C.L., Cairns, N.J., Danek, A., Graff-Radford, N., Ghetti, B., Morris, J.C., Dominantly Inherited Alzheimer Network, 2014. Genetic heterogeneity in Alzheimer disease and implications for treatment strategies. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 14, 499. <https://doi.org/10.1007/s11910-014-0499-8>
- Ripoli, C., Cocco, S., Li Puma, D.D., Piacentini, R., Mastrodonato, A., Scala, F., Puzzo, D., D'Ascenzo, M., Grassi, C., 2014. Intracellular Accumulation of Amyloid- β (A β) Protein Plays a Major Role in A β -Induced Alterations of Glutamatergic Synaptic Transmission and Plasticity. *J. Neurosci.* 34, 12893–12903. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1201-14.2014>
- Rivière, C., Papastamoulis, Y., Fortin, P.-Y., Delchier, N., Andriamanarivo, S., Waffo-Teguo, P., Kapche, G.D.W.F., Amira-Guebalia, H., Delaunay, J.-C., Mérillon, J.-M., Richard, T., Monti, J.-P., 2010. New stilbene dimers against amyloid fibril formation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 3441–3443. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.09.074>
- Rominger, A., Brendel, M., Burgold, S., Keppler, K., Baumann, K., Xiong, G., Mille, E., Gildehaus, F.-J., Carlsen, J., Schlichtiger, J., Niedermoser, S., Wängler, B., Cumming, P., Steiner, H., Herms, J., Haass, C., Bartenstein, P., 2013. Longitudinal assessment of cerebral β -amyloid deposition in mice overexpressing Swedish mutant β -amyloid precursor protein using 18F-florbetaben PET. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 54, 1127–1134. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.114660>
- Rossner, S., Lange-Dohna, C., Zeitschel, U., Perez-Polo, J.R., 2005. Alzheimer's disease beta-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. *J. Neurochem.* 92, 226–234. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02857.x>
- Royo, J., Villain, N., Champeval, D., Del Gallo, F., Bertini, G., Aujard, F., Pifferi, F., 2018. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on cognitive functions, electrocortical activity and neurogenesis in a non-human primate, the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Behav. Brain Res.* 347, 394–407. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.02.029>
- Ruan, L., Kang, Z., Pei, G., Le, Y., 2009. Amyloid deposition and inflammation in APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 6, 531–540. <https://doi.org/10.2174/156720509790147070>
- Rullier, L., Matharan, F., Barbeau, E.J., Mokri, H., Dartigues, J.-F., Pérès, K., Amieva, H., 2014. Test du DMS 48 : normes chez les sujets âgés et propriétés de détection de la maladie d'Alzheimer dans la cohorte AMI. *Gériatrie Psychol. Neuropsychiatr. Vieil.* 12, 321–330. <https://doi.org/10.1684/pnv.2014.0486>
- Ryan, D.A., Narrow, W.C., Federoff, H.J., Bowers, W.J., 2010. An improved method for generating consistent soluble amyloid-beta oligomer preparations for in vitro neurotoxicity

- studies. *J. Neurosci. Methods* 190, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.05.001>
- Sagare, A., Deane, R., Bell, R.D., Johnson, B., Hamm, K., Pendu, R., Marky, A., Lenting, P.J., Wu, Z., Zarcone, T., Goate, A., Mayo, K., Perlmutter, D., Coma, M., Zhong, Z., Zlokovic, B.V., 2007. Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat. Med.* 13, 1029–1031. <https://doi.org/10.1038/nm1635>
- Sagare, A.P., Deane, R., Zlokovic, B.V., 2012. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1: a physiological A β homeostatic mechanism with multiple therapeutic opportunities. *Pharmacol. Ther.* 136, 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.008>
- Salas-Salvadó, J., Becerra-Tomás, N., García-Gavilán, J.F., Bulló, M., Barrubés, L., 2018. Mediterranean Diet and Cardiovascular Disease Prevention: What Do We Know? *Prog. Cardiovasc. Dis.* 61, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2018.04.006>
- Samieri, C., Perier, M.-C., Gaye, B., Proust-Lima, C., Helmer, C., Dartigues, J.-F., Berr, C., Tzourio, C., Empana, J.-P., 2018. Association of Cardiovascular Health Level in Older Age With Cognitive Decline and Incident Dementia. *JAMA* 320, 657–664. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.11499>
- Savonenko, A., Xu, G.M., Melnikova, T., Morton, J.L., Gonzales, V., Wong, M.P.F., Price, D.L., Tang, F., Markowska, A.L., Borchelt, D.R., 2005. Episodic-like memory deficits in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. *Neurobiol. Dis.* 18, 602–617. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.10.022>
- Sawda, C., Moussa, C., Turner, R.S., 2017. Resveratrol for Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1403, 142–149. <https://doi.org/10.1111/nyas.13431>
- Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M., 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 215S–217S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.215S>
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., Younkin, S., 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2, 864–870. <https://doi.org/10.1038/nm0896-864>
- Scheyer, O., Rahman, A., Hristov, H., Berkowitz, C., Isaacson, R.S., Diaz Brinton, R., Mosconi, L., 2018. Female Sex and Alzheimer's Risk: The Menopause Connection. *J. Prev. Alzheimers Dis.* 5, 225–230. <https://doi.org/10.14283/jpad.2018.34>
- Seino, S., Kimoto, T., Yoshida, H., Tanji, K., Matsumiya, T., Hayakari, R., Seya, K., Kawaguchi, S., Tsuruga, K., Tanaka, H., Imaizumi, T., 2018. Gnetin C, a resveratrol dimer, reduces amyloid- β 1-42 (A β 42) production and ameliorates A β 42-lowered cell viability in cultured SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biomed. Res. Tokyo Jpn.* 39, 105–115. <https://doi.org/10.2220/biomedres.39.105>
- Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741–766. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.741>
- Selkoe, D.J., 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487–498. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90052-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90052-2)
- Selkoe, D.J., Hardy, J., 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* 8, 595–608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>

- Sérrière, S., Tauber, C., Vercouillie, J., Mothes, C., Pruckner, C., Guilloteau, D., Kassiou, M., Doméné, A., Garreau, L., Page, G., Chalon, S., 2015. Amyloid load and translocator protein 18 kDa in APP^{swe}PS1-dE9 mice: a longitudinal study. *Neurobiol. Aging* 36, 1639–1652. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.11.023>
- Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P.H., Williams, L., Maier, M., Dunstan, R., Salloway, S., Chen, T., Ling, Y., O’Gorman, J., Qian, F., Arastu, M., Li, M., Chollate, S., Brennan, M.S., Quintero-Monzon, O., Scannevin, R.H., Arnold, H.M., Engber, T., Rhodes, K., Ferrero, J., Hang, Y., Mikulskis, A., Grimm, J., Hock, C., Nitsch, R.M., Sandrock, A., 2016. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer’s disease. *Nature* 537, 50–56. <https://doi.org/10.1038/nature19323>
- Sgourakis, N.G., Yan, Y., McCallum, S.A., Wang, C., Garcia, A.E., 2007. The Alzheimer’s peptides Abeta40 and 42 adopt distinct conformations in water: a combined MD / NMR study. *J. Mol. Biol.* 368, 1448–1457. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.093>
- Shankar, G.M., Leissring, M.A., Adame, A., Sun, X., Spooner, E., Masliah, E., Selkoe, D.J., Lemere, C.A., Walsh, D.M., 2009. Biochemical and immunohistochemical analysis of an Alzheimer’s disease mouse model reveals the presence of multiple cerebral Abeta assembly forms throughout life. *Neurobiol. Dis.* 36, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.021>
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C.M., Walsh, D.M., Sabatini, B.L., Selkoe, D.J., 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer’s brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14, 837–842. <https://doi.org/10.1038/nm1782>
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., Zheng, B., 2019. Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Mol. Basel Switz.* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
- Sharma, Castellani, R.J., Nozari, A., Lafuente, J.V., Tian, Z.R., Ozkizilcik, A., Manzhulo, I., Mössler, H., Sharma, A., 2019. Nanowired delivery of cerebrolysin with neprilysin and p-Tau antibodies induces superior neuroprotection in Alzheimer’s disease. *Prog. Brain Res.* 245, 145–200. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2019.03.009>
- Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S.R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D.M., Miller, C.A., Strickland, D.K., Ghiso, J., Zlokovic, B.V., 2000. Clearance of Alzheimer’s amyloid- β 1-40 peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* 106, 1489–1499.
- Shimmyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T., Sugimoto, H., 2008. Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure–activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1780, 819–825. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.01.017>
- Silva, P., Vauzour, D., 2018. Wine Polyphenols and Neurodegenerative Diseases: An Update on the Molecular Mechanisms Underpinning Their Protective Effects. *Beverages* 4, 96. <https://doi.org/10.3390/beverages4040096>
- Singh, M., Arseneault, M., Sanderson, T., Murthy, V., Ramassamy, C., 2008. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer’s disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4855–4873. <https://doi.org/10.1021/jf0735073>

- Singla, R.K., Dubey, A.K., Garg, A., Sharma, R.K., Fiorino, M., Ameen, S.M., Haddad, M.A., Al-Hiary, M., 2019. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *J. AOAC Int.* 102, 1397–1400. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0133>
- Snowdon, D.A., 2003. Healthy aging and dementia: findings from the Nun Study. *Ann. Intern. Med.* 139, 450–454. https://doi.org/10.7326/0003-4819-139-5_part_2-200309021-00014
- Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y., Nairn, A.C., Salter, M.W., Lombroso, P.J., Gouras, G.K., Greengard, P., 2005. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat. Neurosci.* 8, 1051–1058. <https://doi.org/10.1038/nn1503>
- Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Löwer, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., Masters, C.L., Müller, U., Kins, S., Beyreuther, K., 2005. Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J.* 24, 3624–3634. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600824>
- Spires-Jones, T.L., Hyman, B.T., 2014. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* 82, 756–771. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.004>
- Springer, M., Moco, S., 2019. Resveratrol and Its Human Metabolites-Effects on Metabolic Health and Obesity. *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/nu11010143>
- Steiner, H., Duff, K., Capell, A., Romig, H., Grim, M.G., Lincoln, S., Hardy, J., Yu, X., Picciano, M., Fichteler, K., Citron, M., Kopan, R., Pesold, B., Keck, S., Baader, M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Baumeister, R., Haass, C., 1999. A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 28669–28673. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28669>
- Stenzel, J., Rühlmann, C., Lindner, T., Polei, S., Teipel, S., Kurth, J., Rominger, A., Krause, B.J., Vollmar, B., Kuhla, A., 2019. [18F]-florbetaben PET/CT Imaging in the Alzheimer's Disease Mouse Model APP^{swe}/PS1^{dE9}. *Curr. Alzheimer Res.* 16, 49–55. <https://doi.org/10.2174/1567205015666181022095904>
- Stervbo, U., Vang, O., Bonnesen, C., 2007. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chem.* 101, 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.047>
- Streit, W.J., Xue, Q.-S., 2009. Life and death of microglia. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* 4, 371–379. <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9163-5>
- Suárez-Calvet, M., Kleinberger, G., Araque Caballero, M.Á., Brendel, M., Rominger, A., Alcolea, D., Fortea, J., Lleó, A., Blesa, R., Gispert, J.D., Sánchez-Valle, R., Antonell, A., Rami, L., Molinuevo, J.L., Brosseron, F., Träschütz, A., Heneka, M.T., Struyfs, H., Engelborghs, S., Slegers, K., Van Broeckhoven, C., Zetterberg, H., Nellgård, B., Blennow, K., Crispin, A., Ewers, M., Haass, C., 2016. sTREM2 cerebrospinal fluid levels are a potential biomarker for microglia activity in early-stage Alzheimer's disease and associate with neuronal injury markers. *EMBO Mol. Med.* 8, 466–476. <https://doi.org/10.15252/emmm.201506123>
- Subramaniam, R., Roediger, F., Jordan, B., Mattson, M.P., Keller, J.N., Waeg, G., Butterfield, D.A., 1997. The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins. *J. Neurochem.* 69, 1161–1169. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69031161.x>
- Sun, X.-Y., Dong, Q.-X., Zhu, J., Sun, X., Zhang, L.-F., Qiu, M., Yu, X.-L., Liu, R.-T., 2019. Resveratrol Rescues Tau-Induced Cognitive Deficits and Neuropathology in a Mouse

- Model of Tauopathy. *Curr. Alzheimer Res.* 16, 710–722. <https://doi.org/10.2174/1567205016666190801153751>
- Takahashi, R.H., Nagao, T., Gouras, G.K., 2017. Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol. Int.* 67, 185–193. <https://doi.org/10.1111/pin.12520>
- Takaoka, M., 1940. Of the phenolic substrate of hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *J Fac Sci Hokkaido Imper Univ* 3, 1–16.
- Takeda, S., 2019. Progression of Alzheimer's disease, tau propagation, and its modifiable risk factors. *Neurosci. Res.* 141, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.08.005>
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., Katzman, R., 1991a. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 30, 572–580. <https://doi.org/10.1002/ana.410300410>
- Texidó, L., Martín-Satué, M., Alberdi, E., Solsona, C., Matute, C., 2011. Amyloid β peptide oligomers directly activate NMDA receptors. *Cell Calcium* 49, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.02.001>
- Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M., Braak, H., 2002. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58, 1791–1800. <https://doi.org/10.1212/wnl.58.12.1791>
- Theendakara, V., Peters-Libeu, C.A., Bredesen, D.E., Rao, R.V., 2018. Transcriptional Effects of ApoE4: Relevance to Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* 55, 5243–5254. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0757-2>
- Thinakaran, G., Koo, E.H., 2008. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* 283, 29615–29619. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800019200>
- Tramutola, A., Lanzillotta, C., Perluigi, M., Butterfield, D.A., 2017. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Res. Bull.* 133, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.06.005>
- Turner, R.S., Thomas, R.G., Craft, S., van Dyck, C.H., Mintzer, J., Reynolds, B.A., Brewer, J.B., Rissman, R.A., Raman, R., Aisen, P.S., Alzheimer's Disease Cooperative Study, 2015. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. *Neurology* 85, 1383–1391. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002035>
- Ueno, M., Nakagawa, T., Wu, B., Onodera, M., Huang, C.-L., Kusaka, T., Araki, N., Sakamoto, H., 2010. Transporters in the brain endothelial barrier. *Curr. Med. Chem.* 17, 1125–1138. <https://doi.org/10.2174/092986710790827816>
- Van Dam, D., De Deyn, P.P., 2017. Non human primate models for Alzheimer's disease-related research and drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 12, 187–200. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1271320>
- Van der Linden, M., Coyette, F., Poitrenaud, J., Kalafat, M., Calicis, F., Wyns, C., Adam, S., 2004. L'épreuve de rappel libre / rappel indicé à 16 items (RL/RI-16). *Solal*.
- Van Hung, P., 2016. Phenolic Compounds of Cereals and Their Antioxidant Capacity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 25–35. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.708909>
- Vion, E., Page, G., Bourdeaud, E., Paccalin, M., Guillard, J., Rioux Bilan, A., 2018. Trans ϵ -viniferin is an amyloid- β disaggregating and anti-inflammatory drug in a mouse primary

- cellular model of Alzheimer's disease. *Mol. Cell. Neurosci.* 88, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.12.003>
- Vitrac, X., Desmoulière, A., Brouillaud, B., Krisa, S., Deffieux, G., Barthe, N., Rosenbaum, J., Mérillon, J.M., 2003. Distribution of [¹⁴C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.* 72, 2219–2233. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00096-1](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00096-1)
- Vogelgesang, S., Cascorbi, I., Schroeder, E., Pahnke, J., Kroemer, H.K., Siegmund, W., Kunert-Keil, C., Walker, L.C., Warzok, R.W., 2002. Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics* 12, 535–541. <https://doi.org/10.1097/00008571-200210000-00005>
- Walker, D.G., Kim, S.U., McGeer, P.L., 1995. Complement and cytokine gene expression in cultured microglial derived from postmortem human brains. *J. Neurosci. Res.* 40, 478–493. <https://doi.org/10.1002/jnr.490400407>
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M.H., Oatis, J.E., Walle, U.K., 2004. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 32, 1377–1382. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.000885>
- Walter, J., 2015. Twenty Years of Presenilins--Important Proteins in Health and Disease. *Mol. Med. Camb. Mass* 21 Suppl 1, S41-48. <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00163>
- Wang, J., Ho, L., Zhao, W., Ono, K., Rosensweig, C., Chen, L., Humala, N., Teplow, D.B., Pasinetti, G.M., 2008. Grape-derived polyphenolics prevent Abeta oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 6388–6392. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0364-08.2008>
- Wang, J., Ho, L., Zhao, Z., Seror, I., Humala, N., Dickstein, D.L., Thiyagarajan, M., Percival, S.S., Talcott, S.T., Pasinetti, G.M., 2006. Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates Abeta neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 2313–2320. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6281com>
- Wang, J., Tanila, H., Puoliväli, J., Kadish, I., Groen, T. van, 2003. Gender differences in the amount and deposition of amyloid β in APPswe and PS1 double transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 14, 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.08.009>
- Wang, Q., Walsh, D.M., Rowan, M.J., Selkoe, D.J., Anwyl, R., 2004. Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 3370–3378. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1633-03.2004>
- Wang, R., Zhang, Y., Li, J., Zhang, C., 2017. Resveratrol ameliorates spatial learning memory impairment induced by A β 1–42 in rats. *Neuroscience* 344, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.051>
- Wang, Yunliang, Wang, Yutong, Li, J., Hua, L., Han, B., Zhang, Y., Yang, X., Zeng, Z., Bai, H., Yin, H., Lou, J., 2016. Effects of caffeic acid on learning deficits in a model of Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Med.* 38, 869–875. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2683>
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W., 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1858–1862. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1858>

- Wenk, G.L., Parsons, C.G., Danysz, W., 2006. Potential role of N-methyl-D-aspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: focus on memantine. *Behav. Pharmacol.* 17, 411–424. <https://doi.org/10.1097/00008877-200609000-00007>
- Wibowo, A., Ahmat, N., Hamzah, A.S., Sufian, A.S., Ismail, N.H., Ahmad, R., Jaafar, F.M., Takayama, H., 2011. Malaysianol A, a new trimer resveratrol oligomer from the stem bark of *Dryobalanops aromatica*. *Fitoterapia* 82, 676–681. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.02.006>
- Wight, R.D., Tull, C.A., Deel, M.W., Stroope, B.L., Eubanks, A.G., Chavis, J.A., Drew, P.D., Hensley, L.L., 2012. Resveratrol effects on astrocyte function: relevance to neurodegenerative diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 426, 112–115. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.045>
- Williams, H.M., Oblak, A.L., O'Rourke, R., Buchanan, R., Keezer, K.J., Ingraham, C., Figueiredo, L., Logsdon, B., Sukoff Rizzo, S.J., Carter, G.W., Howell, G., Lamb, B.T., Sasner, M., MODEL-AD Consortium, 2018. P4-028: characterizing the apoe4/trem2*r47h mouse model for late onset alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 14, P1444–P1444. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.06.2430>
- Winblad, B., Poritis, N., 1999. Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 14, 135–146. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1166\(199902\)14:2<135::aid-gps906>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1166(199902)14:2<135::aid-gps906>3.0.co;2-0)
- Worthley, E.G., Schott, C.D., 1965. PHARMACOTOXIC EVALUATION OF NINE VEHICLES ADMINISTERED INTRAPERITONEALLY TO MICE. CHEMICAL RESEARCH AND DEVELOPMENT LABS EDGEWOOD ARSENAL MD.
- Wyss-Coray, T., 2006. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat. Med.* 12, 1005–1015. <https://doi.org/10.1038/nm1484>
- Xiong, H., Callaghan, D., Wodzinska, J., Xu, J., Premyslova, M., Liu, Q.-Y., Connelly, J., Zhang, W., 2011. Biochemical and behavioral characterization of the double transgenic mouse model (APP^{swe}/PS1^{dE9}) of Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.* 27. <https://doi.org/10.1007/s12264-011-1015-7>
- Yamazaki, Y., Kanekiyo, T., 2017. Blood-Brain Barrier Dysfunction and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18091965>
- Yasojima, K., Akiyama, H., McGeer, E.G., McGeer, P.L., 2001a. Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci. Lett.* 297, 97–100. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(00\)01675-x](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01675-x)
- Yasojima, K., McGeer, E.G., McGeer, P.L., 2001b. Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Res.* 919, 115–121. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)03008-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)03008-6)
- Zghonda, N., Yoshida, S., Ezaki, S., Otake, Y., Murakami, C., Mliki, A., Ghorbel, A., Miyazaki, H., 2012. ϵ -Viniferin is more effective than its monomer resveratrol in improving the functions of vascular endothelial cells and the heart. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 954–960. <https://doi.org/10.1271/bbb.110975>
- Zhang, B., Gaiteri, C., Bodea, L.-G., Wang, Z., McElwee, J., Podtelezhnikov, A.A., Zhang, C., Xie, T., Tran, L., Dobrin, R., Fluder, E., Clurman, B., Melquist, S., Narayanan, M., Suver, C., Shah, H., Mahajan, M., Gillis, T., Mysore, J., MacDonald, M.E., Lamb, J.R., Bennett,

- D.A., Molony, C., Stone, D.J., Gudnason, V., Myers, A.J., Schadt, E.E., Neumann, H., Zhu, J., Emilsson, V., 2013. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell* 153, 707–720. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.030>
- Zhao, W.-Q., Santini, F., Breese, R., Ross, D., Zhang, X.D., Stone, D.J., Ferrer, M., Townsend, M., Wolfe, A.L., Seager, M.A., Kinney, G.G., Shughrue, P.J., Ray, W.J., 2010. Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid beta oligomer-induced synaptic disruption. *J. Biol. Chem.* 285, 7619–7632. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.057182>
- Zordoky, B.N.M., Robertson, I.M., Dyck, J.R.B., 2015. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 1155–1177. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.016>

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est actuellement considérée comme la maladie neurodégénérative la plus fréquente. Son incidence est en nette augmentation, du fait du vieillissement croissant de la population et de traitements inefficaces. Elle touche aujourd'hui presque 50 millions de personnes dans le monde dont près de 1,2 millions de Français. Environ 225 000 nouveaux cas sont diagnostiqués en France chaque année, faisant de cette maladie neurodégénérative la quatrième cause de mortalité dans ce pays. Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif de la maladie. Les polyphénols naturels, décrits comme possédant de multiples propriétés, pourraient être des molécules candidates pour le traitement de la MA. En effet, elles ont notamment des activités anti-inflammatoires, inhibitrices de l'agrégation du peptide amyloïde et sont capables de le désagréger. Ainsi, le resvératrol, polyphénol de référence, a été largement étudié dans des modèles cellulaires et animaux ainsi que chez le patient atteint de la MA. Malheureusement, il est très rapidement métabolisé et doit donc être administré à de très fortes doses pour être efficace. La viniférine, dimère naturel du resvératrol extraite à partir des sarments de vigne, pourrait ainsi, de par sa structure chimique, présenter des effets bénéfiques supérieurs à ceux du resvératrol.

Dans une étude antérieure réalisée au laboratoire sur un modèle de souris transgénique de la MA, les souris APP^{swe}PS1^{dE9}, il a été montré que la viniférine, administrée de façon hebdomadaire par voie intrapéritonéale (i.p.), conduisait à une réduction de la taille et de la densité des dépôts amyloïdes ainsi que de la neuroinflammation dans le cerveau des souris. Cependant, ces effets bénéfiques n'ont pas été comparés à ceux du resvératrol. De plus, l'effet de la viniférine sur le déclin cognitif n'a pas été évalué.

L'objectif de cette thèse était donc de comparer les éventuels effets préventifs et/ou curatifs de la viniférine et du resvératrol dans ce modèle murin de la MA sur les dépôts amyloïdes et la neuroinflammation, ainsi que sur le déclin cognitif. Dans une première étude, des souris APP^{swe}PS1^{dE9} ou sauvages ont été traitées par une injection i.p. hebdomadaire de viniférine ou de resvératrol à la dose de 20 mg/kg ou par leur véhicule, le polyéthylène glycol 200 (PEG 200) entre 7 et 11 mois, afin d'évaluer la capacité de ces polyphénols à ralentir l'évolution de la maladie. À 7 mois, les principales lésions caractéristiques de la MA sont déjà présentes chez ces souris. Dans une seconde étude, l'effet préventif des polyphénols injectés de 3 à 12 mois chez ces souris a été recherché (aucune lésion à 3 mois).

Dans ces 2 études *in vivo*, l'évolution du statut cognitif des souris a été évaluée grâce au test comportemental de la piscine de Morris. La charge amyloïde, les dépôts amyloïdes et la neuroinflammation ont été quantifiés par western-blot, ELISA, immunofluorescence et TEP-scan.

Les résultats ont montré que la viniférine diminuait le taux des formes insolubles d'A β ₄₂ et d'A β ₄₀ et les dépôts amyloïdes hippocampiques avec une meilleure efficacité que le resvératrol à 11 mois. De plus, les deux polyphénols ont prévenu partiellement le déclin cognitif. En revanche, ces polyphénols n'ont pas corrigé la neuroinflammation. Ce dernier résultat peut s'expliquer par l'effet pro-inflammatoire du PEG 200, inconnu jusqu'à présent, dans l'hippocampe des souris sauvages traitées par celui-ci. Le traitement par la viniférine de 3 à 12 mois induit aussi une diminution des dépôts amyloïdes. Toutefois, aucun effet sur le déclin mnésique et la neuroinflammation n'est observé. L'effet secondaire du PEG 200 peut masquer l'effet de la viniférine sur les processus inflammatoires et la perte mnésique. D'autres études sont nécessaires avec un autre véhicule ainsi qu'une analyse approfondie de la signature des oligomères pour juger réellement des effets de la viniférine sur la composante amyloïde dans la MA.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer, Viniférine, Resvératrol, Dépôts amyloïdes, Neuroinflammation, Déclin mnésique.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is currently considered as the most common neurodegenerative disease. Its incidence is clearly increasing, due to the aging of the population and the lack of effective treatment. Nowadays, AD affects almost 50 million people worldwide, including nearly 1.2 million French people. About 225,000 new cases are diagnosed each year in France, making this neurodegenerative disease the fourth leading cause of death in this country. Currently, there is no cure against AD, but natural polyphenols found in plants seem to have multiple properties, and could be candidate molecules for the treatment of AD. Indeed, they have anti-inflammatory activities, inhibit the aggregation of the amyloid peptide and are able to disintegrate it. Thus, the resveratrol, a reference polyphenol, has been widely studied in cellular and animal models of AD and in AD patients. Unfortunately, it is very quickly metabolized and therefore must be administered in very high doses to be effective. On the contrary by its chemical structure, viniferin, a dimer of resveratrol extracted from vine shoots, could have more beneficial effects than those of resveratrol.

In a previous study in the laboratory using APP^{swe}PS1^{dE9} transgenic mice, viniferin administered weekly intraperitoneally (i.p.) led to a decrease in the size and the density of amyloid deposits as well as a reduction of neuroinflammation. However, these beneficial effects have never been compared to those of resveratrol. In addition, the role of viniferin on memory decline has not been evaluated in these mice.

Consequently, the objective of this work was to compare the potential preventive and / or curative effects of viniferin and resveratrol in these APP^{swe}PS1^{dE9} mice on amyloid deposits, neuroinflammation and memory decline. In a first part, APP^{swe}PS1^{dE9} or wild-type mice were treated with a weekly i.p. injection of viniferin or resveratrol at a dose of 20 mg / kg or by their vehicle, the polyethylene glycol 200 (PEG 200) between 7 and 11 months, in order to assess the ability of these polyphenols to slow down the progression of the disease. At 7 months of age, these mice already display amyloid deposits and inflammation. The second part of the study focused on the preventive effect of these polyphenols injected from 3 to 12 months (no lesion at 3 months).

In these two *in vivo* studies carried out in parallel, the evolution of the memory status of mice was evaluated using the behavioral test of the Morris water maze. The overall amyloid load, amyloid deposits and neuroinflammation were quantified by western-blot, ELISA, immunofluorescence and PET-scan.

Results showed that viniferin reduced the hippocampal amyloid load (insoluble forms of A β ₄₂ and A β ₄₀) and deposits with better efficiency than resveratrol at 11 months. In addition, the two polyphenols partially prevented memory decline. In contrast, these polyphenols did not rescue neuroinflammation. This last result can be explained by the PEG 200-induced neuroinflammatory effect, not previously described, in the hippocampus of treated wild type mice. In addition, the viniferin treatment from 3 to 12 months also induced a decrease in amyloid deposits. However, no effect on memory decline and neuroinflammation was observed. The side effect of vehicle could mask the response of viniferin in inflammatory process and cognitive decline. Further experiments are needed with another vehicle and an in-depth analysis of the signature of the oligomers to really judge the effect of viniferin on the amyloid component in AD.

Keywords: Alzheimer's disease, Viniferin, Resveratrol, Amyloid deposits, Neuroinflammation, Mnesic decline

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est actuellement considérée comme la maladie neurodégénérative la plus fréquente. Son incidence est en nette augmentation, du fait du vieillissement croissant de la population et de traitements inefficaces. Elle touche aujourd'hui presque 50 millions de personnes dans le monde dont près de 1,2 millions de Français. Environ 225 000 nouveaux cas sont diagnostiqués en France chaque année, faisant de cette maladie neurodégénérative la quatrième cause de mortalité dans ce pays. Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif de la maladie. Les polyphénols naturels, décrits comme possédant de multiples propriétés, pourraient être des molécules candidates pour le traitement de la MA. En effet, elles ont notamment des activités anti-inflammatoires, inhibitrices de l'agrégation du peptide amyloïde et sont capables de le désagréger. Ainsi, le resvératrol, polyphénol de référence, a été largement étudié dans des modèles cellulaires et animaux ainsi que chez le patient atteint de la MA. Malheureusement, il est très rapidement métabolisé et doit donc être administré à de très fortes doses pour être efficace. La viniférine, dimère naturel du resvératrol extraite à partir des sarments de vigne, pourrait ainsi, de par sa structure chimique, présenter des effets bénéfiques supérieurs à ceux du resvératrol.

Dans une étude antérieure réalisée au laboratoire sur un modèle de souris transgénique de la MA, les souris APP^{swePS1dE9}, il a été montré que la viniférine, administrée de façon hebdomadaire par voie intrapéritonéale (i.p.), conduisait à une réduction de la taille et de la densité des dépôts amyloïdes ainsi que de la neuroinflammation dans le cerveau des souris. Cependant, ces effets bénéfiques n'ont pas été comparés à ceux du resvératrol. De plus, l'effet de la viniférine sur le déclin cognitif n'a pas été évalué.

L'objectif de cette thèse était donc de comparer les éventuels effets préventifs et/ou curatifs de la viniférine et du resvératrol dans ce modèle murin de la MA sur les dépôts amyloïdes et la neuroinflammation, ainsi que sur le déclin cognitif. Dans une première étude, des souris APP^{swePS1dE9} ou sauvages ont été traitées par une injection i.p. hebdomadaire de viniférine ou de resvératrol à la dose de 20 mg/kg ou par leur véhicule, le polyéthylène glycol 200 (PEG 200) entre 7 et 11 mois, afin d'évaluer la capacité de ces polyphénols à ralentir l'évolution de la maladie. À 7 mois, les principales lésions caractéristiques de la MA sont déjà présentes chez ces souris. Dans une seconde étude, l'effet préventif des polyphénols injectés de 3 à 12 mois chez ces souris a été recherché (aucune lésion à 3 mois).

Dans ces 2 études *in vivo*, l'évolution du statut cognitif des souris a été évaluée grâce au test comportemental de la piscine de Morris. La charge amyloïde, les dépôts amyloïdes et la neuroinflammation ont été quantifiés par western-blot, ELISA, immunofluorescence et TEP-scan.

Les résultats ont montré que la viniférine diminuait le taux des formes insolubles d'A β ₄₂ et d'A β ₄₀ et les dépôts amyloïdes hippocampiques avec une meilleure efficacité que le resvératrol à 11 mois. De plus, les deux polyphénols ont prévenu partiellement le déclin cognitif. En revanche, ces polyphénols n'ont pas corrigé la neuroinflammation. Ce dernier résultat peut s'expliquer par l'effet pro-inflammatoire du PEG 200, inconnu jusqu'à présent, dans l'hippocampe des souris sauvages traitées par celui-ci. Le traitement par la viniférine de 3 à 12 mois induit aussi une diminution des dépôts amyloïdes. Toutefois, aucun effet sur le déclin mnésique et la neuroinflammation n'est observé. L'effet secondaire du PEG 200 peut masquer l'effet de la viniférine sur les processus inflammatoires et la perte mnésique. D'autres études sont nécessaires avec un autre véhicule ainsi qu'une analyse approfondie de la signature des oligomères pour juger réellement des effets de la viniférine sur la composante amyloïde dans la MA.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer, Viniférine, Resvératrol, Dépôts amyloïdes, Neuroinflammation, Déclin mnésique.