



# Effets des polyphénols de baies sur le déclin cognitif lié au vieillissement chez la souris

Julien Bensalem

► **To cite this version:**

Julien Bensalem. Effets des polyphénols de baies sur le déclin cognitif lié au vieillissement chez la souris. Neurobiologie. Université de Bordeaux, 2014. Français. <NNT : 2014BORD0393>. <tel-01290013>

**HAL Id: tel-01290013**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01290013>**

Submitted on 17 Mar 2016

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

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

# THÈSE

PRÉSENTÉE À

**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Par

**Julien BENSALÉM**

Pour le grade de

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : NUTRITION

---

**EFFETS DES POLYPHÉNOLS DE BAIES  
SUR LE DÉCLIN COGNITIF LIÉ AU  
VIEILLISSEMENT CHEZ LA SOURIS**

---

Soutenue publiquement le 15 décembre 2014

Directrice de thèse : Pr Véronique PALLET

**Membres du jury :**

**Pr Jean-Louis GUILLOU**, Professeur, Université de Bordeaux, Bordeaux

**Président**

**Pr Jeremy SPENCER**, Professeur, University of Reading, Reading

**Rapporteur**

**Pr Frédéric CALON**, Professeur, Université de Laval, Québec

**Rapporteur**

**Dr David VAUZOUR**, Chargé de recherche, University of East Anglia, Norwich

**Examineur**

**Pr Véronique PALLET**, Professeur, IPB, Bordeaux

**Directrice de thèse**

**Dr Pauline LAFENETRE**, MCU, IPB, Bordeaux

**Invité**

**Mr David GAUDOUT**, Directeur recherche et innovation, Activ'Inside, Libourne

**Invité**



# AVANT-PROPOS

Cette thèse de doctorat a été réalisée au sein du laboratoire de Nutrition et Neurobiologie Intégrée (NutriNeurO, INRA UMR1286). Elle a été conduite sous la direction du Professeur Véronique PALLET et co-encadrée par Pauline LAFENÊTRE. Ce travail a été financé par un FUI et mené dans le cadre du consortium NEUROPHENOLS sous la coordination de la société Activ'Inside.

Les résultats obtenus au cours de ce projet ont donné lieu aux publications et communications suivantes :

## Liste des publications

- **Bensalem, J.**, Gaudout, D., Servant, L., Layé, S., Pallet, V.\*, Lafenêtre, P.\*. A polyphenol supplementation can prevent age-induced alterations in the adoption of spatial strategies. *Soumis à Frontiers in Behavioral Neuroscience.*
- **Bensalem, J.**, Gaudout, D., Servant, L., Dudonne S., Desjardins Y., Layé, S., Lafenêtre, P.\*, Pallet, V.\*. A mix of grape and blueberry polyphenol-extracts improve learning, memory and hippocampal neurogenesis in aged mice. *En préparation pour soumission.*
- **Bensalem, J.**, Dal-Pan, A., Gillard, E., Calon, F., Pallet, V. Protective effects of berry polyphenols against age-related cognitive impairment. *Revue en préparation pour soumission à Nutrition and Aging.*
- Effect of a Polyphenol-rich Food Supplement on Cognitive Function in Healthy Aging Adults (Neurophenol). *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02063646*

## Liste des communications affichées

- **Bensalem J.**, Gaudout D., Servant L., Guillard M., Layé S., Pallet V.\*, Lafenêtre P.\*. Polyphenol-rich extracts from plants can prevent age-related cognitive decline by regulating the expression of genes involved in neuronal plasticity. 9<sup>th</sup> FENS Forum of Neuroscience, Milan, Italy, July **2014**.

- Dal-Pan A., Bourdoulous M., **Bensalem J.**, Layé S., Pallet V., Calon F. Cognition-enhancing effects of polyphenols-rich extracts from fruits without changes in neuropathology in an animal model of Alzheimer's disease. 8<sup>th</sup> World Congress of ISANH on Polyphenols Applications 2014, Lisbon, Portugal. June **2014**.
- **Bensalem J.**, Gaudout D., Servant L., Guillard M., Layé S., Lafenêtre P.\*, Pallet V.\*. Polyphenol-rich extracts from berries could prevent age-related cognitive decline: beneficial effect on spatial learning. 8<sup>th</sup> World Congress of ISANH on Polyphenols Applications 2014, Lisbon, Portugal. June **2014**.
- **Bensalem J.**, Gaudout D., Layé S., Lafenêtre P.\*, Pallet V.\*. Effects of polyphenols-rich extracts from plants on age-related cognitive decline. VI International Conference on Polyphenols and Health, Buenos Aires, Argentina, October **2013**. Award: Young Investigator Award from Mars Incorporated.
- Lafenêtre P., **Bensalem J.**, Touyarot K., Layé S., Pallet V. Effects of epicatechin on reference spatial memory in the aged mouse. VI International Conference on Polyphenols and Health, Buenos Aires, Argentina, October **2013**.
- **Bensalem J.**, Gaudout D., Lafenêtre P.\*, Pallet V.\*. Effects of polyphenols-rich extracts from plants on age-related cognitive decline. 11<sup>th</sup> Symposium of the Society for Neurosciences, Lyon, France, May **2013**.
- **Bensalem J.**, Gaudout D., Lafenêtre P.\*, Pallet V.\*. Effect of polyphenols-rich extracts from plant on age-related cognitive decline. 13<sup>th</sup> Scientific Day of Doctoral School of Life Sciences and Health, Arcachon, France, April **2013**.

## **Liste des communications orales**

- **Bensalem J.** Beneficial effects of polyphenols on spatial learning in the aged mice. 14<sup>th</sup> Scientific Day of Doctoral School of Life Sciences and Health, Arcachon, France, April **2014**.
- **Bensalem J.** Polyphenols can prevent age-related memory deficits: beneficial effects on spatial learning. 7<sup>th</sup> Meeting Nutrition & Neurosciences, Bordeaux, France, March **2014**.

- **Bensalem J.**, Pallet V. Effects of polyphenol-rich plant assets on age-related cognitive decline: NEUROPHENOLS project. 3<sup>rd</sup> Scientific Day of the Institute of Nutrition Aquitaine Quebec (INAQ), Bordeaux, France, December 2013.



# REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse : le Pr. **Jean-Louis Guillou** pour avoir accepté la présidence de ce jury, ainsi que le Pr. **Frédéric Calon** et le Pr. **Jeremy Spencer** d'avoir accepté de juger et commenter ce manuscrit. Je tiens également à remercier le Dr. **David Vauzour** d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Je remercie le Dr. **Sophie Layé**, directrice du laboratoire NutriNeurO de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse le Pr. **Véronique Pallet** d'avoir dirigé mon travail et de m'avoir apporté sa confiance tout au long de ma thèse.

Je remercie également Activ'Inside de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Je remercie ainsi **Benoît Lemaire** et **Stéphane Rey**, qui semblent avoir apprécié mon travail sur la piscine de Morris ainsi que ma courte expérience de berger. Je remercie également le reste des membres de l'entreprise : **Patricia Verbeeck**, **Karine Schmitt**, **Cécile Frémont**, **Hesouwe Blakime** et **Benjamin Moras** qui a partagé le statut de thésard à mes côtés. Je remercie tout particulièrement **David Gaudout**, d'avoir suivi ce travail de très près, et d'avoir su être présent tout au long de ma thèse.

Je voudrais également remercier **Pauline Lafenêtre** pour m'avoir encadré, dirigé, aidé, soutenu... et m'avoir appris énormément. Je te remercie vraiment d'avoir été là pendant ces trois années. Sans compté bien sûr que c'est grâce à toi que j'ai pu postuler pour cette thèse. Je remercie par la même occasion **Christelle Durand** qui ne m'a pas oublié au moment où j'en avais besoin.

Je remercie bien sûr **Serge Alfos** et **Katia Touyarot** de m'avoir accompagné, et de m'avoir fait partager votre expérience, et surtout merci pour votre bonne humeur.

Je remercie également les étudiants de master étant passés par là et ayant permis de faire avancer un peu plus le travail.

Bien sûr ce projet de thèse ne constitue qu'une partie du projet Neurophénols et je tiens à remercier tous les partenaires impliqués dans ce consortium et en particulier **Marie-Eve Paradis** qui drive ce projet aux côtés de David à merveille. Je remercie à nouveau Frédéric qui m'a accueilli dans son laboratoire pour une courte durée et **Alexandre Dal-Pan** qui m'a fait découvrir de nouvelles techniques et surtout une nouvelle culture dans un Québec blanc de neige.

Je remercie **Laure Servant** qui a accompli un gros travail pour me permettre d'avancer sur mes manips et que j'ai l'impression d'avoir toujours vu au labo en enchainant ses stages même si tu préférerais travailler avec un barbu.

Merci également à tous les membres des deux équipes du laboratoire, **Anabelle Redonnet**, **Nicole Etchamendy**, **Nathalie Arvy**, **Jean-Benoît Corcuff**, **Pascal Barat**, **Cathy Noël-Suberville**, **Aline Foury**, **Jean-Christophe Helbling**, **Hélène Roumes**, **Paul Higuere**, **Céline Ducroix-Crépy**, **Marie-Pierre Moisan**, **Sylvie Vancassel**, **Corine Joffre**, **Agnès Nadjar**, **Pierre Trifilieff**, **Lucile Capuron**, **Anne-Laure Dinel**, **Thomas Larrieu**, **Helen Beyer**, **Julie Sauvant**, **Agnès Aubert**, **Sandra Dexpert**, **Véronique De Smedt-Peyrusse**, **Alexandra Sere**, **Julie Carrez**, **Clémentine Bosch**, **Vladimir Bogdanov**, **Lin Xia**, **Marina**



**Romaní Pérez, Nathalie Castanon** (qui fait de très bon choix pour ses étudiant(e)s de thèse), et **Muriel Darnaudery, Guillaume Ferreira** toujours présents pour m'apporter des réponses, surtout d'un point de vue comportement, de très bons conseils et merci pour votre gentillesse.

Je voudrais également remercier la machinerie du laboratoire, le pôle secrétariat, et en particulier **Marie-Pierre Manain** qui sait tout faire même quand une personne normale n'en serait pas capable. Je remercie aussi **Julie Desboeuf, Stéphanie Dechery** et **Sylvie Lissandreau**. Merci également à **Isabelle Moreau** qui opère dès l'aurore. Merci également au pôle animalerie, **Claudine Tridon, Cindy Testa** et les meilleurs pour la fin **Philippe Birac**, toujours le mot pour rire et des histoires à n'en plus finir et **Mathieu Cadet** que je remercie non seulement pour son incroyable efficacité et dévouement mais surtout pour m'avoir permis de me faire un super pote.

Je pense bien sûr aux anciens qui sont passés par là et que je remercie, **Julie Brossaud** (toujours un peu présente parmi nous), **Julie Lasselin, Charlotte Madore** sa bonne humeur et son rire mémorable, **Jean-Christophe Delpech** et ses fameuses péripéties, **Chloé Boitard** et **Anne Létondor** que j'ai toutes deux quittées à Toulouse pour vous retrouver à Bordeaux, dans le bureau et grâce à qui ma thèse n'a était que plus sympa.

Bien sûr si on parle des anciens on doit parler des nouveaux et je pense qu'il y a du potentiel, notamment pour la bonne humeur qu'ils vont apporter et qu'ils apportent déjà. Merci **Chloé Lacabanne, Fabien Ducrocq, Quentin Leyrolle, Marion Rincel**, même si vous n'êtes plus vraiment nouveaux, et **Hortense Fanet**. Le bureau n'a qu'à bien se tenir.

Je remercie les doctorants pour qui les trois années sont déjà bien entamées, **Gabriela De-Medeiros, Frédéric Tantot** (tu vas devoir jouer au papa dans le bureau avec tous ces petits jeunes), **Yootana Janthakhin**, et je vous souhaite bon courage.

**Amandine Lepinay**, merci pour ta gaieté et tes délires. On a partagé ce dernier moment de rédaction côte à côte et ce n'était pas facile mais en écrivant ces lignes on voit le bout du tunnel. Heureusement que tu étais là cette dernière année.

Dans ces remerciements je ne peux pas passer à côté des très bonnes rencontres à commencer par **Charlotte Rey**. Très bon public pour mes blagues mais surtout une très bonne amie qui sait être présente, notamment durant cette dernière période de rédaction. Je suis heureux que tu puisses commencer ta thèse aux côtés de ma moitié et que tu nous apportes ta bonne humeur au quotidien.

Dans ces formidables rencontres vient ensuite **Fabrice Casenave**. Frère de barbe ou pas, peu importe, mais merci d'être entré dans nos vies avec ta famille, **Sophia** et le petit **Ary**. C'est comme si le bureau avait perdu une âme quand tu l'as quitté, mais bon, une amitié ne s'arrête pas aux murs d'un simple bureau.

Je ne peux pas l'oublier, **Damien Bonhomme**, un vrai frère. C'est vrai qu'on se connaît depuis le master, mine de rien ça commence à faire quelques années. Partager mes deux premières années de thèse avec toi fut super si bien que Muriel continue de m'appeler Damien à l'occasion. Je te remercie toi mais également **Marion** d'être à mes côtés pour les bons et les mauvais moments. Je remercie par la même occasion ta famille, toujours présente, et puis tu ne serais pas un frère si ce n'était pas un peu ma famille aussi.

Je voudrais enfin remercier ma famille en commençant par mes parents, **Carole** et **Dominique**, qui ont toujours cru en moi et qui croient encore que je fais ça avec facilité... pas vraiment le cas de la thèse mais bon. Voilà c'est fait, j'arrive au bout des études. Merci

également à mes grands-parents **Viviane** et **Michel**, qui m'ont toujours soutenu, le « petit écolier » est devenu grand. Merci également à **Sandrine**, toujours intéressée par ce que je faisais et d'un grand soutien. Merci aussi à mon arrière-grand-mère **Mémé** et à **Henri** qui j'espère seront fiers de voir un premier docteur dans la famille et qui n'ont pas encore besoin de polyphénols vu leur grande forme. Je remercie également ma belle-famille pour leur soutien.

Cette thèse m'aura apporté bien plus que je ne l'aurais espéré, et c'est avec un grand sourire que j'écris ces quelques lignes pour te remercier, **Célia**, ma moitié. Je pense que tu es mon plus grand soutien et tu me comprends si bien que j'ai l'impression qu'on se connaît depuis toujours. Merci d'avoir été à mes côtés, et merci de l'être au quotidien pour m'apporter tant de bonheur. Je t'aime.

# RÉSUMÉ

Il est maintenant bien établi que le vieillissement est lié à l'apparition de troubles cognitifs. Ces altérations mnésiques liées à l'âge peuvent être mises en évidence à la fois chez l'Homme et l'animal. Plusieurs études ont pu mettre en évidence le rôle bénéfique des polyphénols sur les fonctions mnésiques et en particulier sur le déclin mnésique lié au vieillissement.

Ainsi, le projet Neurophénols a pour objectif de mettre au point des actifs nutritionnels riches en polyphénols provenant de raisin et de bleuet, et d'objectiver leur rôle bénéfique sur le déclin cognitif lié à l'âge chez l'Homme et les animaux de compagnie.

L'objectif de cette thèse était de mettre en évidence des effets bénéfiques d'un mélange de polyphénols de raisin et de bleuet, l'extrait Neurophenol®, sur les performances d'apprentissage et de mémoire chez la souris âgée et mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques sous-tendant ces performances. Nous avons plus spécifiquement ciblé l'hippocampe, structure cérébrale clé impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémoire, et particulièrement altérée au cours du vieillissement. Ces travaux précliniques permettront par la suite d'objectiver les résultats obtenus chez l'Homme.

Nos principaux résultats montrent une altération des capacités d'apprentissage et de mémoire dépendant de l'hippocampe au cours du vieillissement qui sont récupérées par une supplémentation en polyphénols. Nous montrons également que ces troubles mnésiques liés à l'âge sont associés à une diminution d'expression de marqueurs moléculaires impliqués dans les voies de signalisation sous-tendant les processus mnésiques ainsi qu'à une diminution de la neurogenèse hippocampique. La supplémentation en polyphénols permet de rétablir les niveaux d'expression de certains gènes et également de sur-réguler l'expression de neurotrophines au niveau hippocampique. De plus, cette supplémentation a un effet bénéfique sur la neurogenèse hippocampique chez les souris âgées. Enfin, nous montrons qu'une supplémentation en Neurophenol® permet de réduire la mortalité des souris âgées.

Ces résultats mettent en évidence l'efficacité du mélange Neurophenol® sur le maintien des performances mnésiques au cours du vieillissement chez la souris, *via* leur action sur la plasticité synaptique et la neurogenèse.

Le développement d'une étude clinique visant à compléter des personnes âgées avec l'extrait Neurophenol® et à évaluer leurs performances mnésiques a également fait partie de ce travail de thèse et les résultats encourageant obtenus chez les souris âgées apportent des arguments favorables quant au bienfait des polyphénols sur la mémoire au cours du vieillissement.

*Mots clés* : Polyphénols, Raisin, Bleuet, Neurophenol®, Vieillissement, Apprentissage, Mémoire, Hippocampe, Plasticité synaptique, Neurogenèse, Espérance de vie, Souris, Homme, Etude clinique

# ABSTRACT

It is now well accepted that aging is linked to the onset of cognitive impairments. Among them, age-related memory alterations can be brought in evidence both in humans and animals. Several studies have highlighted the beneficial role of polyphenols on memory functions and particularly on age-related memory decline.

Thus, the Neurophenols project aims at developing nutritional assets rich in polyphenols from grape and blueberry, and to objectify their beneficial role on the age-related cognitive decline in humans and pets.

The aim of this thesis was to highlight beneficial effects of a polyphenol mix from grape and blueberry, the Neurophenol<sup>TM</sup> extract, on learning and memory performances in aged mice and to better understand the neurobiological mechanisms underlying these performances. More specifically, we have focused on the hippocampus, a key brain structure involved in learning and memory processes that is particularly altered during aging. This preclinical work will subsequently objectify the results in humans.

Our main results show that hippocampal-dependent learning and memory alterations during aging are recovered by a polyphenol supplementation. We also show that these age-related memory deficits are linked to a decrease of gene expression of proteins involved in signaling pathways underlying memory processes and to a decrease of hippocampal neurogenesis. The polyphenol supplementation can restore the expression level of some genes and up-regulate neurotrophin expression in the hippocampus. Moreover, this supplementation has a beneficial impact on hippocampal neurogenesis in aged mice. Finally, we show that a Neurophenol<sup>TM</sup> supplementation can reduce mortality in aged mice.

These results demonstrate the efficiency of the mix Neurophenol<sup>TM</sup> on the maintenance of memory performances in mice during aging, through their action on synaptic plasticity and neurogenesis.

These promising results in aged mice provide positive arguments on the benefits of polyphenols on memory during aging. Thus, it was also developed a clinical study aiming at supplementing elderly subjects with the Neurophenol<sup>TM</sup> extract in order to evaluate their memory performances.

*Key words:* Polyphenols, Grape, Blueberry, Neurophenol<sup>TM</sup>, Aging, Learning, Memory, Hippocampus, Synaptic plasticity, Neurogenesis, Lifespan, Mice, Human, Clinical study

*Title:* Effects of polyphenols from berries on the age-related cognitive decline in mice.



## SOMMAIRE

Liste des illustrations.....	7
Liste des abréviations.....	8
Liste des annexes .....	11
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>13</b>
<b>CHAPITRE I. PROJET NEUROPHENOLS.....</b>	<b>15</b>
<b>I.1. Carte d'identité du projet .....</b>	<b>15</b>
<i>I.1.1. Partenaires du projet .....</i>	<i>16</i>
<i>I.1.1.1. Entreprises:.....</i>	<i>16</i>
<i>I.1.1.2. Cellule de transfert technologique: .....</i>	<i>17</i>
<i>I.1.1.3. Laboratoires publics, organismes de formation:.....</i>	<i>17</i>
<i>I.1.1.4. Prestataires de services:.....</i>	<i>19</i>
<b>I.2. Contexte, enjeux et objectifs du projet .....</b>	<b>19</b>
<i>I.2.1. Les séniors de plus en plus nombreux .....</i>	<i>19</i>
<i>I.2.2. Le déclin cognitif des séniors : une préoccupation de santé publique .....</i>	<i>20</i>
<i>I.2.3. Valorisation de filières agro-alimentaires française (raisin) et canadienne         (bleuet sauvage).....</i>	<i>21</i>
<i>I.2.3.1. La filière française : 2ème producteur mondial de raisin.....</i>	<i>22</i>
<i>I.2.3.2. La filière canadienne : 1er producteur mondial de bleuet sauvage.....</i>	<i>22</i>
<i>I.2.4. Les animaux de compagnie (chien et chat) : enjeux scientifiques et         économiques pour le projet Neurophénols.....</i>	<i>23</i>
<i>I.2.4.1. La sénescence canine : une fatalité physiologique affectant le bien-être             animal.....</i>	<i>23</i>
<i>I.2.4.2. Enjeux économiques de la nutrition pour les animaux seniors (pet food)....</i>	<i>23</i>
<b>I.2.5. Objectifs et caractère innovant du projet Neurophénols .....</b>	<b>24</b>
<i>I.2.5.1. Objectifs .....</i>	<i>24</i>

<i>I.2.5.2. Caractère innovant et différenciant du projet</i> .....	25
<b>I.3. Description des travaux</b> .....	26
<b>CHAPITRE II. MEMOIRE, HIPPOCAMPE ET PLASTICITE CEREBRALE</b> .....	29
<b>II.1. Introduction</b> .....	29
<b>II.2. Hippocampe et processus mnésiques</b> .....	31
<i>II.2.1. L'hippocampe</i> .....	31
<i>II.2.2. Rôle de l'hippocampe</i> .....	32
<b>II.3. Plasticité cérébrale hippocampique et processus mnésiques</b> .....	34
<i>II.3.1. Plasticité synaptique hippocampique et processus mnésiques</i> .....	34
<i>II.3.2. Neurogenèse hippocampique adulte et processus mnésiques</i> .....	37
<i>II.3.3. Neurogenèse et mémoire</i> .....	39
<b>CHAPITRE III. PROCESSUS MNESIQUES ET ALTERATIONS NEUROFONCTIONNELLES AU COURS DU VIEILLISSEMENT</b> .....	41
<b>III.1. Altérations de la mémoire au cours du vieillissement</b> .....	41
<b>III.2. Altérations neurofonctionnelles au cours du vieillissement</b> .....	42
<i>III.2.1. Altérations morphologiques</i> .....	43
<i>III.2.2. Altérations de plasticité cérébrale associées aux déficits mnésiques au cours du vieillissement</i> .....	43
<i>III.2.2.1. Plasticité synaptique au cours du vieillissement</i> .....	43
<i>III.2.2.2. Neurogenèse au cours du vieillissement</i> .....	45
<b>CHAPITRE IV. POLYPHENOLS, MEMOIRE ET VIEILLISSEMENT CEREBRAL</b> 47	
<b>IV.1. Classification des polyphénols, structure chimique et source alimentaire</b> .....	47
<b>IV.2. Apports alimentaires en polyphénols</b> .....	48
<b>IV.3. Biodisponibilité des polyphénols</b> .....	51
<b>IV.4. Biodisponibilité cérébrale</b> .....	52
<b>IV.5. Polyphénols, mémoire et vieillissement</b> .....	53
<i>IV.5.1. Effets des baies sur le déclin cognitif lié à l'âge</i> .....	54

<i>IV.5.2. Flavanols: effets sur le déclin cognitif lié à l'âge</i> .....	56
<i>IV.5.3. Anthocyanes: effets sur le déclin cognitif lié à l'âge</i> .....	58
<i>IV.5.4. Le Resvératrol: effets sur le déclin cognitif lié à l'âge</i> .....	60
<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>65</b>
<b>OBJECTIVES</b> .....	<b>73</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>81</b>
<b>I. Animaux, supplémentation et design expérimental</b> .....	<b>83</b>
<i>I.1. Animaux</i> .....	83
<i>I.2. Supplémentation en polyphénols</i> .....	83
<i>I.3. Séries expérimentales</i> .....	84
<i>I.3.1. Effets des polyphénols sur l'apprentissage, la mémoire et la neurogenèse au cours du vieillissement (série 1)</i> .....	84
<i>I.3.2. Effets des polyphénols sur l'apprentissage spatial au cours du vieillissement (série 2)</i> .....	84
<i>I.3.3. Effets des polyphénols sur l'espérance de vie</i> .....	85
<i>I.3.4. Biodisponibilité des polyphénols de l'extrait Neurophenol® chez la souris</i> .....	85
<b>II. Tests comportementaux</b> .....	<b>86</b>
<i>II.1. Labyrinthe aquatique de Morris</i> .....	86
<i>II.1.1. La familiarisation</i> .....	87
<i>II.1.2. L'apprentissage indicé</i> .....	87
<i>II.1.3. L'apprentissage spatial de référence</i> .....	88
<i>II.1.4. Analyse des stratégies d'apprentissage</i> .....	89
<i>II.1.5. Le probe test</i> .....	90
<i>II.2. Labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus-maze)</i> .....	90
<i>II.3. Labyrinthe en Y</i> .....	91
<i>II.4. Reconnaissance d'objet</i> .....	93
<b>III. Euthanasie des animaux et préparation des tissus</b> .....	<b>94</b>



<b>IV. Études immunohistochimiques : Neurogenèse hippocampique adulte.....</b>	<b>95</b>
<i>IV.1. Immunohistochime : marquage DCX.....</i>	<i>95</i>
<i>IV.2. Déshydratation et montage des coupes.....</i>	<i>95</i>
<i>IV.3. Comptage du nombre de cellules immunoréactives.....</i>	<i>96</i>
<b>V. Études de biologie moléculaire : Quantification des ARNm par RT-qPCR en temps réel.....</b>	<b>96</b>
<i>V.1. Extraction des ARNs.....</i>	<i>96</i>
<i>V.2. Rétro-transcription .....</i>	<i>96</i>
<i>V.3. Amplification.....</i>	<i>97</i>
<i>V.4. Quantification relative de l'expression des gènes étudiés.....</i>	<i>97</i>
<b>VI. Analyses statistiques .....</b>	<b>98</b>
<b>PARTIE I .....</b>	<b>101</b>
<b>EFFET D'UNE SUPPLEMENTATION EN POLYPHENOLS SUR L'APPRENTISSAGE ET LA MEMOIRE ET LA NEUROGENESE ADULTE HIPPOCAMPIQUE AU COURS DU VIEILLISSEMENT .....</b>	<b>103</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>103</b>
<b>II. Méthodologie.....</b>	<b>104</b>
<b>III. Principaux résultats.....</b>	<b>104</b>
<b>IV. Conclusion .....</b>	<b>104</b>
<b>ARTICLE 1 .....</b>	<b>107</b>
<b>PARTIE II .....</b>	<b>135</b>
<b>EFFET D'UNE SUPPLEMENTATION EN POLYPHENOLS SUR L'APPRENTISSAGE SPATIAL AU COURS DU VIEILLISSEMENT .....</b>	<b>137</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>137</b>
<b>II. Méthodologie.....</b>	<b>137</b>
<b>III. Principaux résultats.....</b>	<b>137</b>

IV. Conclusion .....	138
ARTICLE 2 .....	139
<b>PARTIE III .....</b>	<b>161</b>
<b>EFFET D'UNE SUPPLEMENTATION EN POLYPHENOLS SUR LE FONCTIONNEMENT CEREBRAL ET LA MEMOIRE AU COURS DU VIEILLISSEMENT : APPROCHE CLINIQUE .....</b>	<b>163</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>163</b>
<b>II. Objectifs de l'étude.....</b>	<b>164</b>
<b>II.1. Principal objectif.....</b>	<b>164</b>
<b>II.2. Objectifs secondaires.....</b>	<b>164</b>
<b>III. Design de l'étude .....</b>	<b>165</b>
<b>III.1. Critères d'inclusion .....</b>	<b>165</b>
<b>III.2. Critères d'exclusion .....</b>	<b>166</b>
<b>III.3. Produit, dose, administration et durée de supplémentation.....</b>	<b>167</b>
<b>III.4. Conduite de l'étude .....</b>	<b>168</b>
<b>III.4.1. V0: Visite de pré-inclusion (<math>\leq 4</math> semaines avant V1).....</b>	<b>168</b>
<b>III.4.2. V1: visite d'inclusion (D0) .....</b>	<b>169</b>
<b>III.4.3. Premier suivi téléphonique (D0+8 semaines).....</b>	<b>170</b>
<b>III.4.4. Deuxième suivi téléphonique (D0+16 semaines).....</b>	<b>170</b>
<b>III.4.5. V2: visite de fin d'étude (D0+24 semaines).....</b>	<b>170</b>
<b>III.5. Paramètres de sortie .....</b>	<b>171</b>
<b>III.5.1. Paramètre principal .....</b>	<b>171</b>
<b>III.5.2. Paramètres secondaires .....</b>	<b>172</b>
<b>III.5.3. Paramètres exploratoires: paramètres biologiques.....</b>	<b>172</b>
<b>IV. Conclusion .....</b>	<b>174</b>
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>177</b>
<b>I. Résumé des principaux résultats .....</b>	<b>180</b>

<i>I.1. Première étude : Effet d'une supplémentation en polyphénols sur l'apprentissage et la mémoire et la neurogenèse adulte hippocampique au cours du vieillissement.....</i>	<i>180</i>
<i>I.2. Deuxième étude : Effet d'une supplémentation en polyphénols sur l'apprentissage spatial au cours du vieillissement. ....</i>	<i>181</i>
<b>II. Effet des polyphénols sur l'apprentissage et la mémoire au cours du vieillissement .....</b>	<b>183</b>
<i>II.1. Effet du vieillissement et des polyphénols sur l'apprentissage spatial en piscine de Morris.....</i>	<i>183</i>
<i>II.1.1. Déficits d'apprentissage liés au vieillissement.....</i>	<i>183</i>
<i>II.1.2. Effets des polyphénols sur les performances d'apprentissage .....</i>	<i>184</i>
<i>II.1.3. Stratégies d'apprentissage en labyrinthe aquatique de Morris .....</i>	<i>185</i>
<i>II.2. Effet du vieillissement et des polyphénols sur la mémoire de reconnaissance... ..</i>	<i>187</i>
<i>II.2.1. Déficits de mémoire de reconnaissance liés au vieillissement.....</i>	<i>187</i>
<i>II.2.2. Effets des polyphénols sur la mémoire de reconnaissance.....</i>	<i>188</i>
<b>III. Effet des polyphénols sur la plasticité cérébrale au cours du vieillissement .....</b>	<b>189</b>
<i>III.1. Effet du vieillissement et des polyphénols sur l'expression génique .....</i>	<i>189</i>
<i>III.1.1. Expression des kinases ERK, Akt, CaMKII.....</i>	<i>190</i>
<i>III.1.2. Neurotrophines.....</i>	<i>192</i>
<i>III.2. Effet du vieillissement et des polyphénols sur la neurogenèse adulte .....</i>	<i>194</i>
<b>IV. Effet des polyphénols sur la mortalité.....</b>	<b>195</b>
<b>V. Biodisponibilité de l'extrait Neurophénol® .....</b>	<b>196</b>
<b>VI. Conclusion générale et Perspectives.....</b>	<b>197</b>
<b>VII. General conclusion and Perspectives.....</b>	<b>200</b>
 <b>ANNEXES .....</b>	 <b>205</b>
<b>REVUE .....</b>	<b>207</b>
 <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	 <b>231</b>

## **Liste des illustrations**

### ***DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES***

**Figure 1 :** Carte mondiale présentant la prévalence des troubles neurologiques.

**Figure 2 :** Classification des systèmes de la mémoire à long terme.

**Figure 3 :** La formation hippocampique.

**Figure 4 :** Mécanismes d'action de la potentialisation à long terme.

**Figure 5 :** La neurogenèse hippocampique.

**Figure 6 :** Illustration du déclin cognitif lors du vieillissement normal chez l'Homme.

**Figure 7 :** Classification et structures chimiques des principales classes de polyphénols.

**Tableau 1 :** Les principaux types de polyphénols dans le raisin et le bleuet sauvage.

### ***MATÉRIELS ET MÉTHODES***

**Figure 8 :** Procédure comportementale dans le labyrinthe aquatique de Morris.

**Figure 9 :** Classification des stratégies de recherche de la plateforme.

**Figure 10 :** Schéma du labyrinthe en croix surélevé.

**Figure 11 :** Procédure comportementale dans le labyrinthe en Y.

**Figure 12 :** Procédure comportementale dans le test de reconnaissance d'objet.

**Tableau 2 :** Séquences des amorces utilisées.

### ***PARTIE III***

**Figure 13 :** Conduite de l'étude clinique.

**Tableau 3 :** Design de l'étude clinique.

## Liste des abréviations

<b>AChE</b>	<b>Acétylcholinestérase</b>
<b>ADN</b>	<b>Acide Désoxyribonucléique</b>
<b>Akt</b>	<b>Protéine kinase B</b>
<b>AMPA</b>	<b><math>\alpha</math>-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</b>
<b>ANOVA</b>	<b>ANalysis Of VAriance</b>
<b>AP-1</b>	<b>Activator Protein 1</b>
<b>Arc/Arg3</b>	<b>Activity-regulated cytoskeleton-associated protein</b>
<b>ARN</b>	<b>Acide Ribonucléique</b>
<b>BDNF</b>	<b>Brain Derived Neurotrophic Factor</b>
<b>BHE</b>	<b>Barrière Hémato-Encéphalique</b>
<b>BrdU</b>	<b>Bromodéoxyuridine</b>
<b>Ca</b>	<b>Calcium</b>
<b>CA</b>	<b>Corne d'Ammon</b>
<b>CaMK</b>	<b>Calmodulin-dependent Kinase</b>
<b>CANTAB</b>	<b>Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery</b>
<b>CNP</b>	<b>2':3'-Cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase</b>
<b>COX</b>	<b>Cyclo-Oxygénase</b>
<b>CREB</b>	<b>cAMP-Response Element-Binding protein</b>
<b>DAB</b>	<b>3,3-Diaminobenzidine</b>
<b>DCC</b>	<b>Dysfonctionnement Cognitif Canin</b>
<b>DCX</b>	<b>Doublecortine</b>
<b>DCX-IR</b>	<b>Doublecortine Immunoréactive</b>
<b>D-gal</b>	<b>D-galactose</b>
<b>DLT</b>	<b>Dépotentialisation à Long Terme</b>
<b>dNTP</b>	<b>Désoxyribonucléotides</b>
<b>EFSA</b>	<b>European Food Safety Authority</b>
<b>ERK</b>	<b>Extracellular signal Regulated Kinase</b>
<b>FDA</b>	<b>US, Food and Drug Administration</b>
<b>FH</b>	<b>Formation hippocampique</b>
<b>GABA</b>	<b>Gamma-Aminobutyric Acid</b>
<b>GAP43</b>	<b>Neuromoduline</b>
<b>GAPDH</b>	<b>Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase</b>
<b>GD</b>	<b>Gyrus Dentelé (ou Gyrus Denté)</b>

<b>GDS</b>	<b>Geriatric Depression Scale</b>
<b>GFAP</b>	<b>Glial Fibrillary Acid Protein</b>
<b>HDL</b>	<b>High Density Lipoprotein</b>
<b>IgG</b>	<b>Immunoglobulines de type G</b>
<b>IL-1b</b>	<b>Interleukin-1 beta</b>
<b>IMC</b>	<b>Indice de Masse Corporelle</b>
<b>iNOS</b>	<b>Inducible Nitric Oxide Synthase</b>
<b>ITI</b>	<b>Intertrial Interval</b>
<b>JNK</b>	<b>c-Jun N-terminal Kinase</b>
<b>LDL</b>	<b>Low Density Lipoprotein</b>
<b>LPS</b>	<b>Lipopolysaccharide</b>
<b>MAPK</b>	<b>Mitogen-Activated Protein Kinase</b>
<b>mARN</b>	<b>Acide Ribonucléique messenger</b>
<b>MFI-20</b>	<b>Multidimensional Fatigue Inventory</b>
<b>MINI</b>	<b>Mini International Neuropsychiatric Interview</b>
<b>MMSE</b>	<b>Mini-Mental State Examination</b>
<b>MnSOD</b>	<b>Manganese Superoxide Dismutase</b>
<b>MRC-5</b>	<b>Human fetal lung fibroblast</b>
<b>Msil</b>	<b>Mouse-Musashi1</b>
<b>mTOR</b>	<b>Mammalian Target Of Rapamycin</b>
<b>NeuN</b>	<b>Neuronal Nuclear</b>
<b>NF-κB</b>	<b>Nuclear Factor-kappa B</b>
<b>NGF</b>	<b>Nerve Growth Factor</b>
<b>NMDA</b>	<b>N-Methyl-D-Aspartic acid or N-Methyl-D-Aspartate</b>
<b>NO</b>	<b>Nitric Oxide</b>
<b>Nrf2</b>	<b>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</b>
<b>NSE</b>	<b>NeuronSpecificEnolase</b>
<b>OMS</b>	<b>Organisation Mondiale de la Santé</b>
<b>p38</b>	<b>P38 mitogen-activated protein kinases</b>
<b>PA</b>	<b>Proanthocyanidines</b>
<b>PAL</b>	<b>Paired Associate Learning</b>
<b>PASE</b>	<b>Physical Activity Scale for the Elderly</b>
<b>PBMC</b>	<b>Peripheral Blood Mononuclear Cells</b>
<b>PBS</b>	<b>Phosphate Buffered Saline</b>
<b>PCNA</b>	<b>Proliferating Cell Neuronal Antigen</b>

<b>PFA</b>	<b>Paraformaldéhyde</b>
<b>PI3K</b>	<b>Phosphoinositide 3-Kinase</b>
<b>PKA</b>	<b>Protéine Kinase A</b>
<b>PLT</b>	<b>Potentialisation à Long Terme</b>
<b>PSA-NCAM</b>	<b>Polysialylated form of the Neural Cell Adhesion Molecule</b>
<b>PSD-95</b>	<b>Postsynaptic Density protein 95</b>
<b>PSPC</b>	<b>Purple Sweet Potato Color</b>
<b>RBP</b>	<b>Retinol Binding Protein</b>
<b>RC3</b>	<b>Neurogranine</b>
<b>ROS</b>	<b>Reactive Oxygen Species</b>
<b>RT-qPCR</b>	<b>Polymérase Chain Reaction</b>
<b>S6K</b>	<b>S6 Kinase</b>
<b>SAMP8</b>	<b>Senescence-Accelerated Mouse Prone 8</b>
<b>SIRT1</b>	<b>Sirtuine 1</b>
<b>SOD</b>	<b>Superoxide Dismutase</b>
<b>SSP</b>	<b>Spatial Span</b>
<b>THS</b>	<b>Traitement Hormonal Substitutif</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></b>
<b>TrKA</b>	<b>Tyrosine Kinase A / récepteur au NGF</b>
<b>TrkB</b>	<b>Tyrosine Kinase B / récepteur au BDNF</b>
<b>TSH</b>	<b>Thyroid Stimulating Hormone</b>
<b>TTR</b>	<b>Transthyretin</b>
<b>TuJ1</b>	<b>Neuron-specific class III beta-tubulin</b>
<b>UE</b>	<b>Union Européenne</b>
<b>UPLC-MS/MS</b>	<b>Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer</b>
<b>Us-CRP</b>	<b>Ultra-sensitive C-Reactive Protein</b>
<b>UV</b>	<b>Ultra-Violet</b>
<b>V</b>	<b>Visite</b>
<b>VPAL</b>	<b>Verbal Paired Associate Learning</b>
<b>VRM</b>	<b>Verbal Recognition Memory</b>

## Liste des annexes

**Annexe 1: Revue: Bensalem, J., Dal-Pan, A., Gillard, E., Calon, F., Pallet, V. Protective effects of berry polyphenols against age-related cognitive impairment. *Revue en préparation pour soumission à Nutrition and Aging***





## **INTRODUCTION**



## **CHAPITRE I. PROJET NEUROPHENOLS**

La population humaine vieillit : le nombre de seniors de plus de 65 ans ne cesse d'augmenter et représentera 16 % de la population mondiale en 2050 (contre 7,5% en 2011). Les animaux de compagnie (chien, chat) de plus de 7 ans représentent un marché en progression avec des produits spécifiquement formulés. Pour l'Homme comme pour l'animal de compagnie, le **vieillessement** s'accompagne de l'apparition de symptômes spécifiques et notamment d'un **déclin cognitif** lié au vieillissement cérébral. Plusieurs études préliminaires ont mis en évidence le rôle bénéfique que peut jouer l'alimentation sur ce déclin, à l'instar de celles portant sur la consommation de polyphénols issues des végétaux.

L'objet principal du projet franco-canadien **Neurophénols** est de mettre au point des **actifs nutritionnels alimentaires riches en polyphénols** synergiques, formulés et différenciés de la concurrence -notamment par l'emploi d'éco-procédés- ayant un rôle bénéfique sur le **déclin cognitif** chez **l'Homme et les animaux de compagnie**.

Avec l'appui de leurs partenaires scientifiques, les actifs mis au point par les deux entreprises (PME) française et québécoise seront directement testés et objectivés en tant que complément alimentaire et « pet-food » développés par les deux autres partenaires industriels du projet (également français et québécois). Ces deux groupes industriels bénéficient d'une position de leader sur leur marché respectif, permettant d'optimiser la rapidité de la mise sur le marché au niveau mondial des innovations du projet tout en garantissant des retombées économiques importantes et des débouchés commerciaux pour l'ensemble des partenaires industriels.

Afin de pérenniser la valeur ajoutée du projet, ces innovations seront brevetées et intégreront dès leur conception les nouvelles attentes du marché en termes scientifique, technologique, réglementaire et économique.

### **I.1. Carte d'identité du projet**

**Identification du pôle d'appartenance** : VALORIAL

**Thématiques du pôle auxquelles se rattache le projet** : Ingrédients fonctionnels - Nutrition-Santé

**Nom du projet** : **NEUROPHÉNOLS** : Développement d'actifs végétaux ayant un effet bénéfique nutritionnel sur le déclin mnésique normal lié au vieillissement

**Porteur** : ACTIV'INSIDE

**Durée prévue du projet:** 48 mois

**Date de début des travaux :** octobre 2011

### ***1.1.1. Partenaires du projet***

#### ***1.1.1.1. Entreprises:***

#### **1. ACTIV'INSIDE – 31 impasse Lacapelle 33 500 LIBOURNE - France**

**Responsable du projet : David GAUDOUT**

ACTIV'INSIDE est une Jeune Entreprise Innovante qui conçoit, développe, produit, markete et commercialise des actifs végétaux (en particulier issue du raisin) vecteurs d'allégation pour les industries de la nutrition et de la santé (+de 50% du CA à l'export). L'entreprise dispose d'une invention brevetée (produit/procédé) lui permettant d'obtenir des allégations nutritionnelles et de santé (en accord avec les avis de l'EFSA) sur des extraits végétaux (notamment riches en polyphénols) en utilisant un procédé d'éco-extraction à l'eau qui sera utilisé dans le cadre de ce projet.

#### **2. LABORATOIRE ATRIUM INNOVATIONS – 1405, boulevard du Parc Technologique QUEBEC G1P 4P5 - Québec**

**Responsable du projet : Serge YELLE**

Atrium Innovations Inc. est un leader reconnu du monde de l'innovation, de la formulation, de la production et de la commercialisation de produits scientifiquement reconnus pour l'industrie de la nutrition et de la santé (suppléments alimentaires). Atrium concentre ses efforts prioritairement sur les segments en croissance des marchés qui bénéficient de l'élan vers de meilleures habitudes de vie et du vieillissement de la population. Atrium peut ainsi mettre sur le marché un large portfolio de produits par son réseau de ventes hautement spécialisé -telle la visite médicale- et ses professionnels en marketing dans plus de 35 pays, principalement en Amérique du Nord et en Europe (notamment Hollande et Allemagne). Atrium dispose de 7 usines de production et commercialise sous 9 marques comme Orthica, Douglas Lab. ou Nutri Health.

#### **3. NUTRACANADA – 240 route Sainte Marie, CHAMPLAIN G0X 1C0 - Québec**

**Responsable du projet : André GOSSELIN**

NUTRACANADA est la première et seule entreprise canadienne spécialisée dans la fabrication d'extraits végétaux à partir de biomasses résiduelles de fruits et de légumes. Elle transforme principalement la canneberge, le bleuet et la fraise ainsi que le brocoli, l'épinard et

l'oignon. NutraCanada a mis en place un procédé unique d'extraction en collaboration avec le CNRC (Conseil national de recherches Canada) qui permet la récupération des solvants et l'emploi de biogaz comme source principale d'énergie. Le procédé de transformation de la société répond aux exigences des bonnes pratiques de fabrication (GMP) pour les produits de santé naturels ainsi qu'aux exigences pour les produits certifiés 'biologiques'.

#### **4. SPF Diana – ZA du Gohélis – 56 250 ELVEN - France**

##### **Responsable du projet : Hervé IRDEL**

Le groupe DIANA Ingrédients est un groupe international leader spécialisé dans les ingrédients naturels. SPF est la filiale du groupe DIANA Ingrédients dédiée à l'appétence des aliments pour animaux de compagnie et se positionne comme leader mondial sur son marché. Dans l'objectif d'offrir des solutions toujours plus dédiées à ses partenaires Pet-food, SPF a développé une activité nutraceutique dénommée Vit2Be. Vit2Be accompagne les fabricants de pet-food dans le développement et la différenciation de leurs gammes physiologiques et thérapeutiques. Dans cette philosophie, des ingrédients nutraceutiques destinés au Bien-être et la vitalité des animaux de compagnie (chiens et chats) sont proposés.

##### *1.1.1.2. Cellule de transfert technologique:*

#### **5. POLYPHÉNOLS BIOTECH (PPB) – Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) – 210 Chemin de Leysotte CS 50008 - 33 882 VILLENAVE D'ORNON Cedex - France**

##### **Responsable du projet : Dr. Jean-Michel Mérillon**

PPB est l'une des quatre Cellules de Transfert Technologique de l'ISVV. PPB assure la prise en charge de programmes de R&D pour les PME et grands groupes (Cosmétique/Pharmacie/Agro-alimentaire Nutrition-Santé). Pour mener à bien les prestations qui lui sont confiées, une équipe de docteurs et techniciens hautement qualifiés et expérimentés en Chimie des Substances Naturelles et Biotechnologies gère les programmes de R&D en s'appuyant sur les moyens scientifiques de l'Equipe GESVAB (EA 3675, ISVV, Université de Bordeaux).

##### *1.1.1.3. Laboratoires publics, organismes de formation:*

#### **6. INAF (Institut sur la nutrition et les Aliments Fonctionnels) – Pavillon des Services, bureau 17102440, boulevard Hochelaga Université Laval - QUEBEC - G1V 0A6EA**

**Thématique de recherche : neurosciences (Omega 3/maladie d'Alzheimer)**

**Responsable du projet : Dr. Renée MICHAUD**

L'INAF est le plus important regroupement de chercheurs au Canada à se consacrer entièrement aux interactions complexes entre les aliments, leurs composantes, la nutrition et la santé. L'INAF réalise un programme de recherche multidisciplinaire innovateur et soutient le développement de produits alimentaires efficaces et sécuritaires pour améliorer la santé et prévenir les maladies chroniques.

**7. INRS (Institut National de la Recherche Scientifique) – Institut Armand Frappier 531 Boulevard des Prairies LAVAL, H7V 1B7 - Québec**

**Thématiques de recherche : neurotoxicité cérébrale, physiopathologie de la maladie d'Alzheimer**

**Responsable du projet : Dr. Charles RAMASSAMY**

L'équipe travaille sur les mécanismes neurotoxiques induits par divers types de pro-oxydants et les conséquences au niveau cérébral. En parallèle les effets protecteurs des antioxydants d'origines diverses (endogène, nutraceutique, nutritionnelle) sont étudiés. Au niveau moléculaire, des analyses sont également effectuées sur l'impact des composés pro-oxydants et des antioxydants sur la régulation de facteurs de transcription nucléaire qui sont sensibles au potentiel rédox intracellulaire.

**8. ONIRIS – Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique**

**Unité Nutrition et Endocrinologie - Site de la Chantrerie 44 307 NANTES Cedex 3 – France**

**Thématique de recherche : nutrition et endocrinologie animale (chien et chat)**

**Responsable du projet : Pr. Patrick NGUYEN**

Le laboratoire du Pr. Nguyen est l'une des équipes de recherche européenne la plus en pointe dans le domaine de la nutrition et du métabolisme du chien et du chat. (Physiopathologie / stress oxydatif / composés bioactifs / modèles animaux / obésité / dyslipidémie / omega 3).

**9. Le laboratoire Nutrition et Neurobiologie intégrée : 'NutriNeuro' UMR 1286 INRA/Université de Bordeaux/Bordeaux INP - 146 rue Léo Saignat, bâtiment Pharmacie 2ème tranche, 2ème étage 33 076 BORDEAUX Cedex - France**

**Thématique de recherche : impact de la nutrition sur la fonction cérébrale**

**Responsable du projet : Dr. Véronique PALLET**

Le laboratoire de Nutrition et Neurobiologie Intégrée, NutriNeurO étudie l'impact de la nutrition sur les fonctions cérébrales et le développement de troubles de l'humeur et de la cognition. Véronique Pallet y dirige l'équipe « Nutrition, récepteurs nucléaires et vieillissement cérébral ».

### *1.1.1.4. Prestataires de services:*

- **BIOFORTIS (Merieux Nutrisciences Corporation)** : cette société de recherche sous contrat (CRO) est spécialisée dans les études cliniques en nutrition humaine. (protocoles/obligations légales/montage et coordination des études cliniques/monitoring)
  
- **INTERVIVO SOLUTIONS Inc.** (Canada) : cette société de recherche sous contrat est spécialisée dans le développement et l'évaluation des effets de la nourriture, des nutraceutiques et des médicaments sur le comportement et le bien-être animal (études pré-clinique et clinique chez l'animal) et bénéficie d'une reconnaissance mondiale dans le domaine. Le modèle animal (chien) dont elle dispose est utilisé dans l'élaboration de produits destinés à l'Homme.
  
- **NUTRATECH CONSEILS** : cette société est spécialisée dans l'accompagnement des industriels dans le domaine de l'innovation en agro-nutrition santé. Elle propose des prestations et expertises en relation avec le projet : accompagnement dans la mise au point de procédés d'extraction de végétaux, scale up industriel, réglementation, conception de produits en intégrant les données du mix produit, assistance en matière de PI (la société a accompagné Activ'Inside dans le dépôt de son brevet produit/procédé).

## **1.2. Contexte, enjeux et objectifs du projet**

### *1.2.1. Les séniors de plus en plus nombreux*

Le vieillissement de la population mondiale à l'horizon 2050 est une tendance inscrite dans la pyramide des âges et amplifiée par l'allongement de la durée de vie ainsi qu'une stagnation de la fécondité. Selon les données de l'INED -Institut National d'Etudes Démographiques (France)-, la proportion de personnes âgées de 65 ans ou plus passera ainsi de **7.67%** en 2011 à **16.25%** de la population totale mondiale en 2050 (soit 1.5 milliard de personnes âgées environ sur 9.15 milliards d'individus). Au niveau **européen**, la part des séniors passera de **16.45%** à **27.37%** de la population européenne à l'horizon 2050 (soit 189

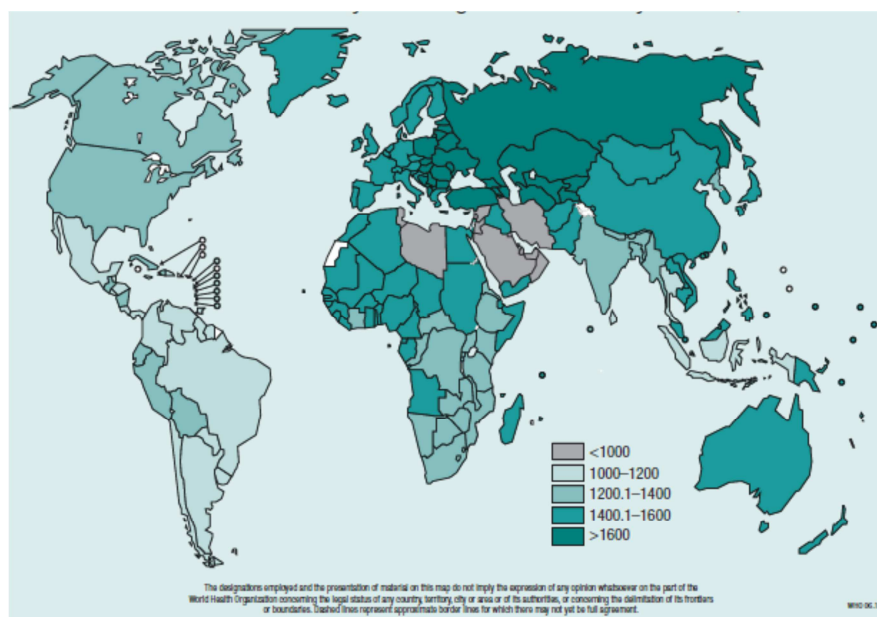


millions de séniors sur 691 millions d'européens) ; et en Amérique septentrionale -USA + Canada-, l'évolution sera de **13.29%** à **21.96%** sur cette population entre 2011 et 2050, ce qui représente 98.5 millions de séniors sur 448 millions de personnes.

### *1.2.2. Le déclin cognitif des séniors : une préoccupation de santé publique*

Le déclin cognitif se caractérise par une altération non pathologique mais significative des fonctions cognitives incluant notamment des troubles de la mémoire et de la vigilance. Certains médecins s'accordent à dire que 10 à 15% des séniors touchés par ces troubles présentent un état annonciateur de la maladie d'Alzheimer. Selon le rapport de l'OMS « Troubles neurologiques : défis pour la santé publique (2007) », près d'un milliard d'habitants de notre planète souffrent de troubles neurologiques, dont 24 millions de la maladie d'Alzheimer et autres démences (**Figure 1**).

Ces troubles affectent des individus de tous les pays, indépendamment de leur sexe, leur niveau d'éducation ou de leur revenu. Il est estimé que 6.8 millions de personnes meurent chaque année des suites de troubles neurologiques.



**Figure 1 : Carte mondiale présentant la prévalence des troubles neurologiques en EVCI (espérance de vie corrigée de l'incapacité, OMS 2005) par 100 000 habitants.**

Le coût des troubles neurologiques pour l'économie a été évalué par exemple en Europe en 2004 à 139 milliards d'euros. Une meilleure prise en charge du vieillissement et de ses pathologies associées, la participation au maintien des personnes dans un meilleur état

physique général avec des fonctions vitales préservées sont donc des enjeux économiques et de santé publique majeurs en France comme au Canada.

Avec le vieillissement de la population, en parallèle de recherches médicales à visée curatives des maladies liées au déclin cognitif, des **approches novatrices et en particulier dans le domaine de l'alimentation et de la nutrition peuvent cibler la « prévention » du déclin cognitif des séniors**. Dans ce contexte, la prise de conscience du rôle de l'alimentation sur la cognition ne cesse de prendre de l'ampleur à l'instar des travaux scientifiques réalisés sur la consommation de poissons (oméga-3) ou de fruits et légumes (polyphénols).

### *1.2.3. Valorisation de filières agro-alimentaires française (raisin) et canadienne (bleuet sauvage)*

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés au niveau structural par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Le raisin et le bleuet sauvage se distinguent par une composition différente en polyphénols -notamment en termes de flavonoïdes (**Flavan-3-ols et anthocyanes**) et de **stilbènes**- pouvant être **complémentaire** et **synergique** en termes d'activité (**Tableau 1**).

		<b>Raisin (<i>Vitis vinifera</i>)</b>	<b>Bleuet sauvage (<i>Vaccinium angustifolium</i>)</b>
<b>Flavonoïdes</b>	<b>Flavan-3-ols</b>	Catéchines, épicatechine, proanthocyanidines gallocatéchines, prodelfinidines et gallotanins. <u>Teneur</u> : 350 mg de catéchines/kg et 1-6g de polymères de flavan-3-ols/kg.	<u>Teneur</u> : 3 mg/kg de poids sec de procyanidines (type B uniquement ; Prior <i>et al.</i> , 2001).
	<b>Anthocyanes</b>	3-monoglucosides d'anthocyanidine (malvidine) et dérivés acylés dans les pellicules de raisin noir. <u>Teneur</u> : 500-3000 mg/kg.	<b>16 anthocyanines</b> différentes, principalement sous formes de cyanidine glucosides (glucoside, galactoside, arabinoside) et de dérivés acylés. <u>Teneur</u> : 1700 mg/kg de poids sec .
<b>Stilbènes</b>		<b>Resvératrol</b> majoritaire (forme <i>cis</i> et <i>trans</i> ) principalement dans les <b>pellicules</b> . Formes glycosylées (trans-picéide) ou oligomères (viniférines) du resvératrol <u>Teneur</u> : 0,3-237 µg resv/g poids frais.	Teneurs en <i>trans</i> -resvératrol très faibles par comparaison avec le raisin : 12 ng/g (Lyons <i>et al.</i> , 2003).

**Tableau 1 : Les principaux types de polyphénols dans le raisin et le bleuet sauvage**

### *I.2.3.1. La filière française : 2ème producteur mondial de raisin*

L'Europe est le premier producteur mondial de raisins avec 294 543 milliers de quintaux. **La France produit plus du quart de la production européenne et occupe la 2ème place** (*données OIV 2007*).

Les applications de la vigne concernent essentiellement le vin et dans une moindre mesure le raisin de table et les jus. En France, la filière viti-vinicole est prépondérante (1er producteur mondial de vin avec 17.95% de la production, *estimation Vinexpo 2010*).

Cette filière viti-vinicole intègre aussi les transformateurs impliqués dans la **valorisation des co-produits de la vigne et du vin** (marcs de raisin contenant la pellicule et les pépins, sources de polyphénols), notamment les **distilleries** (colorants naturels, acide tartrique, pépins de raisin...), les extracteurs (actifs polyphénoliques), les PME utilisatrices (par ex. cosmétiques Caudalie). Les **matières premières qui sont utilisées dans ce projet sont issues uniquement des distilleries françaises** avec lesquelles travaillent déjà le porteur du projet. Selon la Fédération nationale des distilleries coopératives vinicoles le chiffre d'affaires généré par les distilleries françaises en 2005 était estimé à 160 millions € et 1 million de tonnes de marc était traité.

Cette filière viti-vinicole connaît des difficultés structurelles qui risquent d'être accrues au regard de la modification annoncée de l'Organisation Commune du Marché Viti-vinicole (arrêt des prestations viniques qui touchera directement les distilleries), prévue en 2015 par le Commissaire européen en charge de la Politique Agricole Commune. A cela s'ajoute une montée en puissance de la concurrence des économies émergentes comme la Chine qui valorisent à des coûts très bas des extraits issus du raisin. C'est dans ce contexte que la recherche de nouveaux débouchés pour les entreprises telles que les distilleries se justifie encore plus aujourd'hui.

### *I.2.3.2. La filière canadienne : 1er producteur mondial de bleuet sauvage*

Le Canada a une longue histoire de culture des bleuets. Le Canada et en particulier le Québec joue un rôle déterminant dans cette industrie en croissance. Les agriculteurs cultivent 2 sortes de bleuet : le bleuet en corymbe (domestique) et le bleuet nain (sauvage) dont les baies sont plus petites et riches en anthocyanes.

Le Canada est le plus gros producteur au monde de bleuets 'sauvages' dont la plupart sont cultivés à des fins commerciales au Québec et dans les provinces de l'Atlantique. Leur

culture est particulière car ils ne sont pas plantés ; les producteurs gèrent des peuplements sauvages qui s'étendent naturellement par des stolons souterrains.

En termes de superficie cultivée, les bleuets constituent la principale culture fruitière du pays depuis 1996, devant les pommes. La production annuelle est supérieure à 75 000 tonnes au Canada (dont 40 900 t pour le bleuets sauvage) et depuis 2000 l'exportation est considérable, représentant 84 à 100% de la production canadienne, les Etats-Unis représentant le premier marché d'exportation, suivi par l'Allemagne mais aussi le Japon (*Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2009*). Le chiffre d'affaires de la production de bleuets est estimé à **30 millions CAN \$**.

### ***1.2.4. Les animaux de compagnie (chien et chat) : enjeux scientifiques et économiques pour le projet Neurophénols***

#### *1.2.4.1. La sénescence canine : une fatalité physiologique affectant le bien-être animal*

Comme chez l'Homme, le vieillissement chez le chien et le chat s'accompagne de modifications morphologiques, métaboliques mais aussi physiologiques, tant au niveau des capacités physiques que mentales. Il faut distinguer :

- le vieillissement cérébral normal qui engendre le déclin des fonctions cognitives (perte de mémoire, diminution de la capacité d'apprentissage...) (Milgram, 2003; Boutet et al., 2005; Christie et al., 2005).
- le dysfonctionnement cognitif canin (DCC) qui est un syndrome bien défini, similaire à celui qui est observé dans la maladie d'Alzheimer chez l'Homme. Ce syndrome se caractérise par une modification du comportement du chien : une désorientation, une perturbation des interactions sociales, des anomalies des cycles du sommeil, une baisse de l'activité générale. La prévalence de ce dysfonctionnement augmente avec l'âge (Neilson et al., 2001). Les modifications cérébrales sont également similaires (le dépôt de peptide A beta formant des plaques amyloïdes) (Cummings et al., 1993; Colle et al., 2000).

#### *1.2.4.2. Enjeux économiques de la nutrition pour les animaux seniors (pet food)*

A l'image de la population humaine, l'âge moyen des chiens a considérablement augmenté ces dernières années, notamment grâce à l'amélioration des connaissances en nutrition et aux avancées de la médecine vétérinaire. Aux Etats-Unis, on dénombre entre 20 à

30 millions de chiens de plus de 7 ans (AVMA, 2002), ce qui correspond approximativement à 30-40 % de la population totale canine de cette zone. En Europe, l'estimation est identique avec 25 à 45 % des chiens de plus de 7 ans. La notion de vieillesse doit être nuancée et corrélée à la taille de l'animal. Les petits chiens ont une espérance de vie plus longue, ils seront ainsi considérés comme des seniors à partir de 10 ans.

Il est, en revanche, conseillé de fournir une alimentation adaptée « senior » dès l'âge de 5 ans pour les chiens de grandes tailles. On admet que l'espérance de vie, toutes races confondues, est de l'ordre de 13 ans (Dairin, 1996). Cette alimentation particulière, spécialement formulée pour répondre aux besoins nutritionnels des seniors aide à les maintenir le plus longtemps possible en bonne santé en retardant au maximum l'apparition des signes de vieillesse, signes qui peuvent devenir problématiques pour le maître (abolement, destruction, propreté, etc.) (Landsberg et al., 2003). Ainsi la consommation annuelle de croquettes sur la cible des chiens séniors est comprise entre **700 000 tonnes et 900 000 tonnes**.

Du fait du rôle du stress oxydant dans l'apparition des maladies neurodégénératives, les antioxydants ont naturellement été étudiés chez le chien et le chat. Il a ainsi été montré que les performances cognitives du chien âgé étaient améliorées par une supplémentation en antioxydants (Milgram et al., 2002; Milgram et al., 2004; Milgram et al., 2005; Siwak et al., 2005; Nippak et al., 2007; Araujo et al., 2008).

Dans le cadre de ce projet les données scientifiques obtenues sur le chien pourront être transposées au chat.

### ***1.2.5. Objectifs et caractère innovant du projet Neurophénols***

#### *1.2.5.1. Objectifs*

#### **Objectifs Industriels:**

- Développer de nouvelles activités économiques internationales en valorisant les filières raisin (valorisation de co-produits de la vigne) et bleuet dans le domaine de la nutrition santé (axe « prévention » nutritionnel du déclin cognitif) :
  - En amont : développer des actifs nutritionnels
  - En aval : développer leurs applications (compléments alimentaires et pet-food)

- Pérenniser la valeur ajoutée en apportant des réponses (scientifiques, technologiques, réglementaires et économiques) aux nouvelles attentes (barrières à l'entrée) du marché et en protégeant les innovations du projet (brevets et savoir-faire)
- Développer le partenariat fournisseur/client des quatre industriels franco-canadiens.

#### **Objectifs Technologiques:**

- Développer de **nouveaux actifs naturels riches en polyphénols rendus uniques** car caractérisés, standardisés, formulés, objectivés à base de **raisin et de bleuet**. Ces extraits naturels seront obtenus par des **éco-procédés innovants** (notamment en termes d'extraction). Ils ne rentreront pas dans le champ d'application de la réglementation européenne Novel Food (Règl. CE n°258/97) et seront conçus pour répondre aux exigences en matière d'allégations nutritionnelles et de santé de l'EFSA.

#### **Objectifs Scientifiques:**

- Caractériser, objectiver l'**efficacité** et les **mécanismes d'action** d'une **association de polyphénols de raisin et de bleuet** sur le déclin cognitif ;
- Développer un partenariat entre recherche académique/recherche privée et entre la France et le Québec dans le domaine de la **nutrition** et des **neurosciences**.

##### *1.2.5.2. Caractère innovant et différenciant du projet*

Il existe nombre d'extraits de raisin génériques (et dans une moindre mesure de bleuet) provenant notamment de Chine qui revendiquent simplement une activité antioxydante. De plus, en 2010, les demandes d'allégations de santé en ce sens ont toutes été invalidées par l'EFSA et la FDA.

La principale innovation de ce projet porte sur le développement d'actifs, à savoir des extraits, **différents** des extraits existants:

- d'une part, parce qu'ils sont obtenus par des **procédés propres et innovants** (sans solvant autres que l'eau et l'éthanol) et caractérisés par une **composition spécifique** (polyphénols d'intérêt **standardisés** issus du raisin et du bleuet)
- d'autre part, parce qu'ils ciblent des **applications** dans le domaine de la **Nutrition et des Neurosciences** chez l'**Homme** comme chez l'**animal** tout en intégrant les nouvelles exigences réglementaires (notamment en Europe).

La seconde innovation de ce projet tient dans l'originalité de la démarche :

- association d'études de l'activité biologique et d'études mécanistiques,
- étude de l'activité biologique par combinaison d'approches préclinique et clinique chez le chien et chez l'homme.

### **I.3. Description des travaux**

Le projet Neurophénols associe les compétences des différents partenaires dans des domaines variés afin de mettre au point des actifs issus du raisin et du bleuet, de les standardiser en polyphénols et d'étudier leur impact sur le déclin cognitif dans le cadre d'une supplémentation alimentaire.

Pour ce faire, ce projet a été décomposé en 6 lots.

#### **LOT 1 : Caractérisation analytique des actifs du raisin et du bleuet sauvage**

Partenaires impliqués : PPB, INAF et Activ'Inside et NutraCanada pour la fourniture des matières première végétales

#### **LOT 2 : Mise au point de produits industriels standardisés (ingrédients et produits finis)**

Partenaires impliqués : Activ'Inside, NutraCanada, SPF, Atrium, INAF, PPB

#### **LOT 3 : Etude des polyphénols sur le fonctionnement cérébral et la mémoire : approche expérimentale sur modèles cellulaires et modèles animaux (souris et chien)**

Partenaires impliqués : NutriNeurO, Polyphénols Biotech, ONIRIS, INRS, Activ'Inside, NutraCanada, SPF

Prestataire(s) : ENVT, InterVivo Solutions Inc.

*Etude in vivo (modèles souris)*

**Objectif :** étude de l'effet d'une supplémentation avec un mélange d'extraits de bleuets et de raisins sur les performances de mémoire et d'apprentissage et sur certains processus neurobiologiques au cours du vieillissement sain (modèle souris âgées : UMR NutriNeurO, Bordeaux) et pathologique (modèle souris Alzheimer : équipe Frédéric Calon, Québec). Deux aspects mécanistiques sont plus particulièrement explorés : l'effet sur la plasticité cérébrale d'une part, et sur la pathologie synaptique et le métabolisme de la protéine amyloïde d'autre part.

### *Etude in vitro (modèles cellulaires)*

**Objectif :** A partir des résultats observés sur la souris, l'utilisation de cultures de cellules *in vitro* doit permettre de préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans la neuroprotection par les polyphénols testés *in vivo*. Les études sont focalisées sur l'effet anti-inflammatoire et antioxydants et sont menés conjointement à Bordeaux (Polyphénols Biotech) et au Québec (Institut Armand Frappier).

### *Etude modèle chien*

**Objectif :** déterminer l'efficacité d'une supplémentation nutritionnelle en extrait de raisin et de bleuet chez le chien âgé sur les performances cognitives, d'une part, et sur les paramètres métaboliques, d'autre part.

Suite à l'évaluation de l'efficacité sur des modèles souris, l'impact de l'incorporation des extraits raisin et bleuet dans un pet-food est évalué sur le modèle chien. Ceci constitue une étape primordiale dans la démonstration de l'effet du/des produits finis. Le modèle « Chien » présente en effet des avantages importants. Il permet tout d'abord d'élargir l'étude de l'activité des extraits « raisin » et « bleuet » sur la mémoire à un modèle animal supplémentaire tout en conservant l'objectif ultime d'une application chez l'Homme.

### **LOT 4 : Etude des polyphénols sur le fonctionnement cérébral et la mémoire : approche clinique**

Partenaires impliqués : NutriNeurO, INAF, Activ'Inside, NutraCanda, Atrium

Prestataire(s) : Biofortis CRO

L'étude clinique bicentrique est menée en parallèle en France et à Québec.

**Objectif principal :** Etudier l'effet d'une supplémentation nutritionnelle avec un mélange d'extrait de bleuet/raisin sur les performances de mémoire de sujets âgés en population générale, présentant un déclin mnésique normal. **Cette étude randomisée, en double aveugle, contrôlée par placebo, d'une durée de 6 mois est de type bicentrique avec un même nombre de sujets en France et à Québec.**

### **LOT 5 : Valorisation industrielle et scientifique. Préparation à la mise sur le marché**

Partenaires impliqués : tous les partenaires

### **LOT 6 : Gestion du projet NEUROPHÉNOLS**

Partenaires impliqués : Activ'Inside, INAF

Prestataire : Valuatis



Les travaux de thèse présentés par la suite portent essentiellement sur le lot 3 (étude *in vivo* sur modèle de souris âgées) et le lot 4 (étude clinique).

## CHAPITRE II. MEMOIRE, HIPPOCAMPE ET PLASTICITE CEREBRALE

### II.1. Introduction

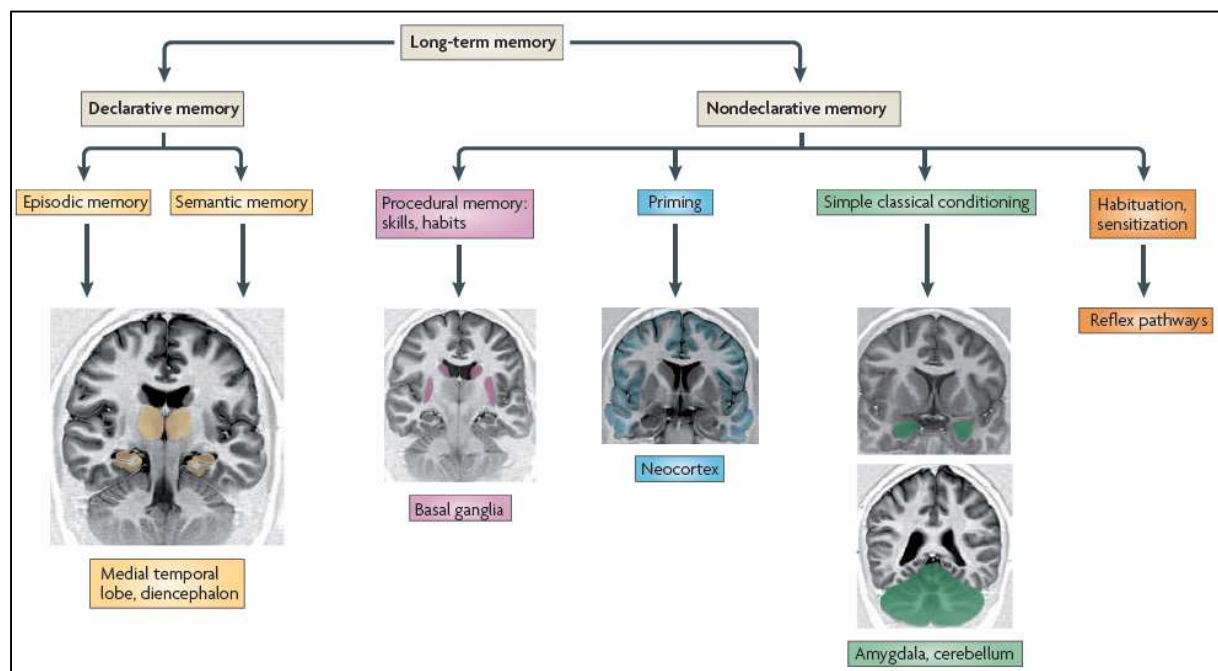
La mémoire est une fonction complexe dépendant de l'intégrité de plusieurs structures cérébrales. En psychologie, il a été proposé de distinguer deux grands types de mémoire : la mémoire à court terme et la mémoire à long terme. La mémoire à long terme, par opposition à la mémoire à court terme, est la capacité à retenir une information pendant une durée beaucoup plus importante.

Squire en 1992 a proposé une classification dichotomique de la mémoire à long terme. Même si elle a été améliorée au cours de ces dernières années, la classification a peu évolué (Squire, 2004; Henke, 2010), et reste encore la plus communément utilisée de nos jours. Elle sépare la mémoire à long terme en deux grands sous-systèmes : la mémoire déclarative et la mémoire non-déclarative (**Figure 2**). Ces différents systèmes de mémoire, systèmes interactifs, se différencient par leur mode de codage, de stockage et de rappel de l'information ainsi que par les structures cérébrales qu'ils mettent en jeu (McDonald et al., 2004).

Chez l'Homme, la mémoire déclarative, également appelée mémoire explicite est accessible à la conscience. Elle dépend essentiellement de l'intégrité du lobe temporal médian et est divisée en deux sous-mémoires : la mémoire sémantique et la mémoire épisodique. Ce système de mémoire, relativement bien défini anatomiquement, implique des interactions entre les structures corticales et les régions sous corticales limbiques, dont l'hippocampe. Alors que la mémoire sémantique regroupe nos connaissances générales des faits publics (Quoi ?), la mémoire épisodique quant à elle, constitue nos souvenirs autobiographiques et peut être définie en termes d'enregistrement des faits de la vie quotidienne qui sont accessibles à la récupération consciente. Elle intègre une notion spatiale et temporelle à ceux-ci (Quoi, Où et Quand ?). Ainsi l'hippocampe interviendrait dans ce type de mémoire en permettant la mémorisation des faits et événements dans un contexte spatio-temporel, et de relier, comparer ou opposer, ces items en mémoire (notion de mémoire relationnelle). La mémoire déclarative se caractérise aussi par une flexibilité d'utilisation de ses représentations dans des situations nouvelles. Cette flexibilité reposerait sur l'élaboration de *représentations relationnelles* en partie grâce aux propriétés associatives des synapses hippocampiques. Ainsi, chaque indice de l'environnement serait encodé au sein de ce réseau; non seulement l'information elle-même mais également l'ensemble des relations qu'elle a avec d'autres informations acquises en même temps ou antérieurement. La combinaison des représentations

relationnelles rendue possible par les opérations de comparaison et d'opposition permet la réactivation simultanée d'informations qui n'ont pas été acquises dans le même contexte d'apprentissage et à des temps différents. Cette récupération est pertinente et adaptée à la situation auquel l'organisme est confronté. Cette capacité souligne la propriété fondamentale de la mémoire déclarative, sa flexibilité d'utilisation (Eichenbaum, 1992).

Chez l'animal, la mémoire déclarative n'est pas évaluable en tant que telle car elle est par définition, accessible à la récupération consciente et donne généralement lieu à une expression verbale ou comportementale des souvenirs. Deux stratégies peuvent alors être mises en œuvre afin de la modéliser chez l'animal. La première vise à réduire la mémoire déclarative à ses propriétés élémentaires (Quoi, Où et Quand?), et à interroger l'animal dans des paradigmes comportementaux testant spécifiquement l'une ou plusieurs de ces propriétés. La seconde consiste en l'étude de la capacité de l'animal à réaliser des tâches d'apprentissage et de mémoire dépendantes de l'intégrité de l'hippocampe, structure cérébrale sous-tendant chez l'homme la mémoire déclarative (Sharma et al., 2010).



**Figure 2 : Classification des systèmes de la mémoire à long terme.**

*Source : Henke, (2010)*

## II.2. Hippocampe et processus mnésiques

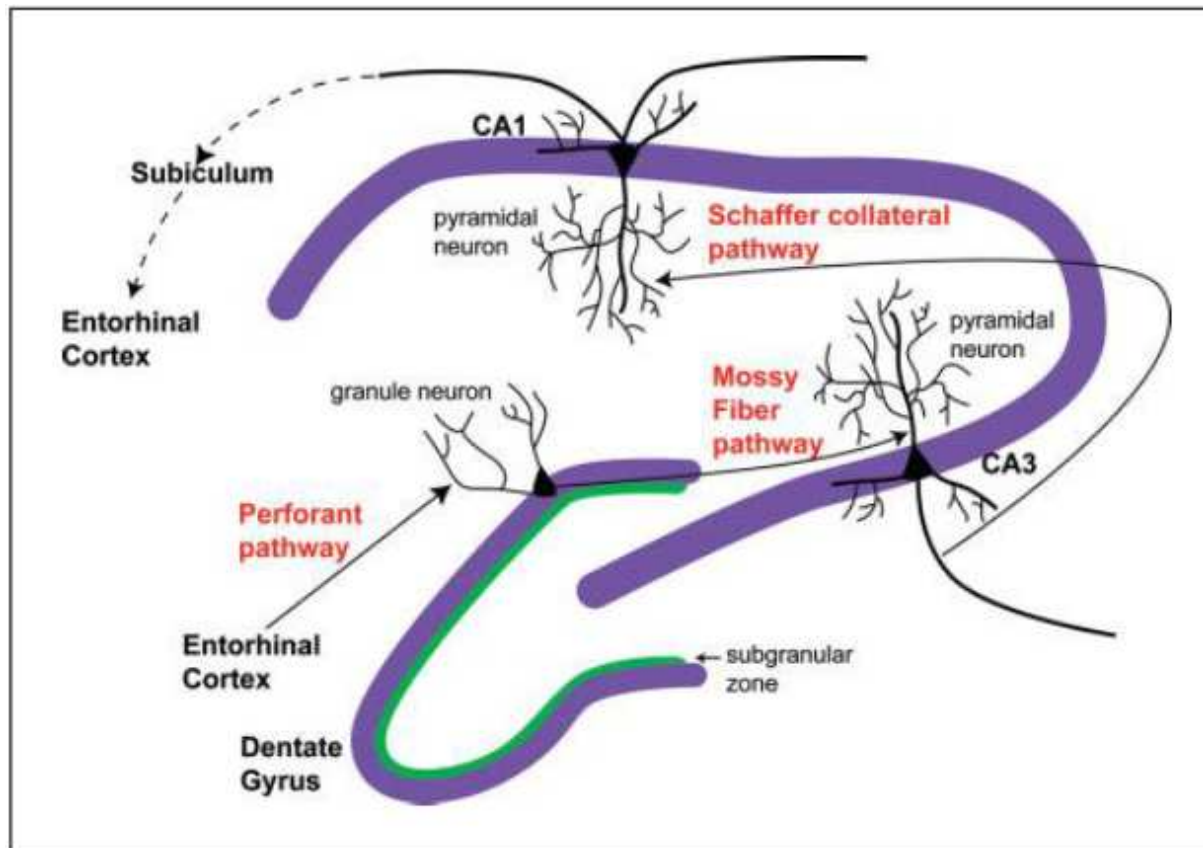
### II.2.1. L'hippocampe

L'hippocampe est une structure cérébrale télencéphalique bilatérale située dans le lobe temporal médian. Il appartient au système limbique, un ensemble de structures impliquées dans l'intégration de processus cognitifs tels que les émotions ou la mémoire.

L'hippocampe est formé de deux structures : le gyrus dentelé (GD) et la corne d'Ammon (CA). Sur la base de différences morphologiques et de ses connexions synaptiques, la CA est subdivisée en trois parties : CA1, CA2, CA3. Le GD est constitué de cellules granulaires alors que les CA sont principalement composées de cellules pyramidales. Ces deux populations cellulaires représentent 88% des cellules hippocampiques. Les autres cellules présentes au niveau de l'hippocampe sont pour la plupart des neurones GABAergiques (Somogyi and Klausberger, 2005). Dans l'hippocampe, le flux d'information est unidirectionnel. Le circuit le plus simple, également appelé circuit de Papez, est constitué d'une voie principale excitatrice tri-synaptique mettant en jeu plusieurs groupes de neurones (McCaffery et al., 2006) (**Figure 3**) :

- (1) Les cellules pyramidales du cortex entorhinal projettent au niveau des cellules granulaires du GD. Ces projections axonales sont également appelées fibres perforantes. C'est la voie d'entrée du circuit.
- (2) Les axones des cellules granulaires, également appelés fibres moussues, projettent au niveau des cellules pyramidales de l'aire CA3. Les axones de ces cellules se ramifient en deux parties: une partie forme les fibres commissurales projetant vers l'hippocampe controlatéral *via* le corps calleux et l'autre partie forme les collatérales de Schaffer qui vont connecter les cellules de l'aire CA1.
- (3) Les neurones du CA1 projettent hors de l'hippocampe par le fornix, vers le subiculum qui contacte en retour au niveau du cortex entorhinal fermant ainsi la boucle anatomique. C'est la voie de sortie du circuit et l'information peut ainsi retourner vers les aires corticales d'où elle provenait.

Au sens strict du terme, l'ensemble formé par le GD, les CA, le complexe subiculaire (subiculum, parasubiculum, présubiculum) et le cortex entorhinal constitue la formation hippocampique (FH).



**Figure 3 : La formation hippocampique.**

*Source : McCaffery et al., (2006)*

### ***II.2.2. Rôle de l'hippocampe***

Les travaux menés chez l'animal ont permis d'envisager plusieurs théories sur la fonction de l'hippocampe et sur la façon dont les systèmes cérébraux qui lui sont associés seraient chargés d'assurer le traitement et la mise en mémoire des informations.

L'idée que l'hippocampe est critique pour l'encodage et la conservation d'informations spatiales recueillies dans l'environnement sous une forme proche de celle d'une carte est maintenant largement acceptée par la communauté scientifique. Cette théorie des cartes spatiales envisage que l'hippocampe ait pour fonction principale d'encoder et de stocker les informations spatiales pour la formation et l'utilisation de cartes cognitives de l'environnement (O'Keefe and Conway, 1978; Morris et al., 1986b). L'un des arguments en faveur de cette théorie a été la découverte des cellules dites "de lieu" dans l'hippocampe, cellules ayant la spécificité d'encoder l'information spatiale et de ne décharger que lorsque l'animal se trouve à un emplacement précis dans l'espace dans lequel il évolue (O'Keefe and

Dostrovsky, 1971; O'Keefe and Conway, 1978; Jarrard, 1993). Cette population de cellules "de lieu" permettrait la formation "d'une carte cognitive" de l'environnement de l'animal (Wood and Dudchenko, 2003). C'est pourquoi l'intégrité de l'hippocampe est requise lors de stratégie dite de type allocentrique grâce à laquelle les lieux sont localisés au sein d'une carte spatiale fondée sur les relations de position entre les indices visuels présents dans l'environnement. De nombreuses données étayent cette théorie en montrant notamment que l'hippocampe joue un rôle critique dans la mémoire spatiale, à la fois chez l'Homme et le rongeur (Maguire et al., 1996a; Maguire et al., 1996b; Abrahams et al., 1997; Maguire et al., 1998). Plus précisément, il a été démontré que l'apprentissage et la mémoire spatiale sont plus particulièrement dépendants de l'hippocampe dorsal (Moser et al., 1993), au niveau duquel la neurotransmission cholinergique occupe une place importante (Cassel et al., 1997; Bartus, 2000).

La mémoire spatiale chez l'animal a largement été étudiée en utilisant des tests comportementaux comme l'utilisation d'une épreuve de navigation dans le labyrinthe aquatique de Morris (Morris, 1984; D'Hooge and De Deyn, 2001). En effet, ce test permet d'évaluer l'aptitude de l'animal à établir une représentation spatiale basée sur l'encodage des relations existant entre différentes informations. Au cours du test, l'animal doit encoder l'environnement sous forme d'une carte spatiale afin de localiser l'emplacement d'une plateforme immergée. L'implication de l'hippocampe dans cette épreuve de navigation spatiale a été montrée par des études lésionnelles (Morris et al., 1982; Moser et al., 1995; de Hoz et al., 2005), des études pharmacologiques (Morris et al., 1986a; Riedel et al., 1999; Micheau et al., 2004), de transgénèse (Sakimura et al., 1995; Tsien et al., 1996; Cho et al., 1998), d'électrophysiologie (O'Keefe and Dostrovsky, 1971; O'Keefe and Conway, 1978; Moser et al., 1998) ou bien encore à l'aide de marqueurs d'activité cellulaire (Guzowski et al., 2000; Guzowski et al., 2001; Teixeira et al., 2006).

La théorie de la mémoire relationnelle suggère quant à elle que l'hippocampe serait impliqué dans des processus plus généraux de gestion de l'information regroupés sous le terme de mémoire relationnelle (Eichenbaum et al., 1990; Marighetto et al., 1999; Etchamendy et al., 2003; Touzani et al., 2003). Cette forme de mémoire plus générale ne serait pas limitée au seul traitement des informations spatiales et permettrait la mise en relation d'informations retenues en mémoire et de les utiliser dans une nouvelle situation (Eichenbaum and Cohen, 1988).

### **II.3. Plasticité cérébrale hippocampique et processus mnésiques**

Il est maintenant bien établi que les processus d'apprentissage et de mémoire nécessitent la mise en place de modifications durables et la constitution de réseaux neuronaux permettant de sous-tendre l'information. Les processus conduisant à ces transformations sont regroupés sous le terme de plasticité cérébrale qui inclut à la fois la plasticité synaptique et la neurogenèse.

#### ***II.3.1. Plasticité synaptique hippocampique et processus mnésiques***

La plasticité synaptique se définit comme la capacité des neurones à modifier leurs propriétés (morphologiques, chimiques et fonctionnelles) au cours du temps. L'hippocampe, structure clé dans les processus d'apprentissage, a été largement décrit comme étant le siège de phénomènes de plasticité synaptique (Morris, 2006).

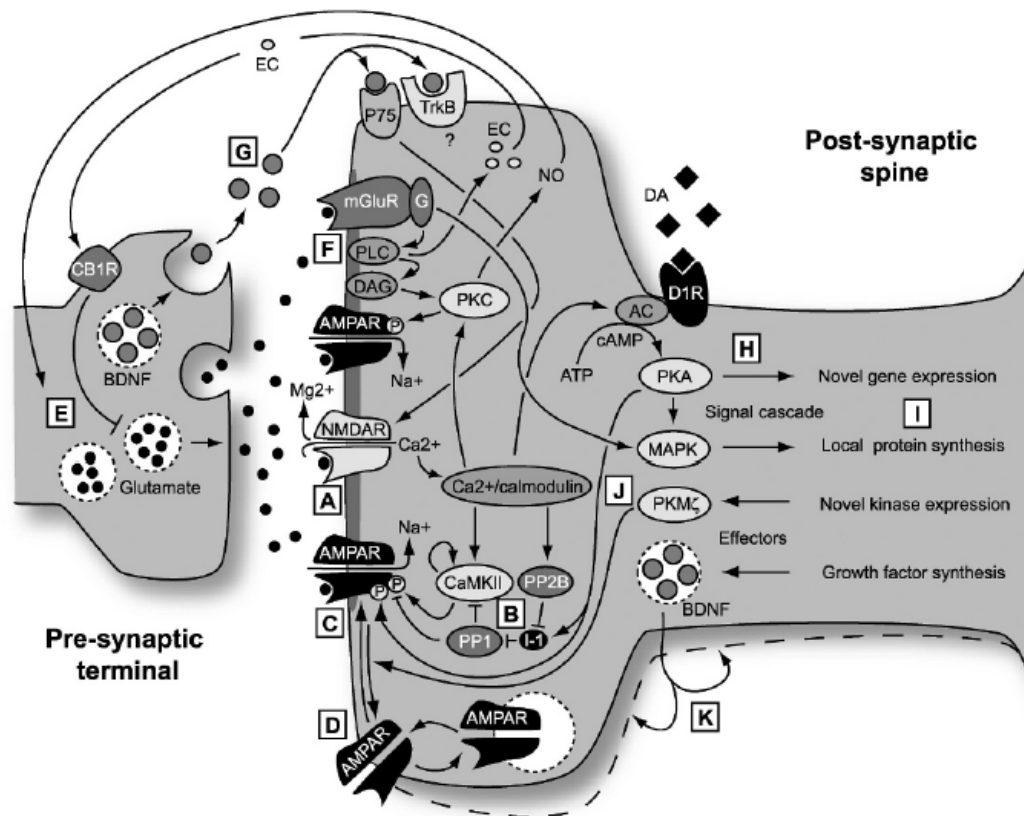
La potentialisation à long terme (PLT) est la première forme de plasticité synaptique mise en évidence chez le mammifère (Bliss and Lomo, 1973). Elle se caractérise par une augmentation rapide et durable de l'amplitude des potentiels post-synaptiques (au niveau extracellulaire) enregistrés dans le GD mais également par une diminution du seuil d'induction du potentiel d'action. Cette PLT n'est observée qu'après une stimulation "tétanique" (stimulation à haute fréquence) des fibres perforantes et n'a pas seulement été montrée que dans le GD mais également dans les différentes régions de l'hippocampe : CA1 (Izquierdo et al., 2008), CA3 (Dumas and Foster, 1995).

L'hypothèse selon laquelle la PLT sous-tendrait la formation de la mémoire a été appuyée par de nombreuses études. En effet, des mesures de PLT dans l'hippocampe ont été corrélées avec les niveaux de performance des animaux dans de nombreux tests d'apprentissage et de mémoire spatiale (Jaffard and Jeantet, 1981; Jodar and Kaneto, 1995; Jaffard et al., 1996).

Il existe plusieurs formes de PLT mais dans les régions CA1 et GD, la PLT la plus décrite est celle dépendante de l'activation des récepteurs au glutamate NMDA (Zhong et al., 2006; Bliss and Cooke, 2011; Drever et al., 2011). Le phénomène de PLT-NMDA peut être décrit de la manière suivante : (1) une stimulation à haute fréquence de la région pré-synaptique entraîne une libération de glutamate au niveau de la synapse. (2) La fixation du glutamate sur les récepteurs AMPA et NMDA entraîne une dépolarisation au niveau synaptique. (3) La dépolarisation post synaptique associée à la fixation du glutamate sur le

récepteur NMDA va induire une ouverture des canaux et ainsi l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. (4) L'augmentation intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule va être à l'origine de l'activation d'une cascade moléculaire de signalisation aboutissant à des mécanismes de synthèse protéique. Les conséquences qui en résultent sont des changements durables de l'efficacité de la transmission du signal qui peuvent se traduire par exemple au niveau pré-synaptique par une augmentation de la libération de neurotransmetteurs ou au niveau post-synaptique par le recrutement de récepteurs glutamatergiques (**Figure 4**). La transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans la facilitation de la transmission suite à une PLT a également été mise en évidence. Parmi ces molécules de signalisation, certaines se retrouvent au niveau pré-synaptique comme synaptophysine et neuromoduline (GAP43), et d'autres sont situées dans le compartiment post-synaptique comme PSD-95 et neurogranine (RC3). Par ailleurs, d'autres protéines telles que les facteurs de croissance BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) ou encore NGF (Nerve Growth Factor) jouent également un rôle important dans les processus de plasticité synaptique. Le facteur trophique BDNF est une protéine sécrétée au niveau des compartiments pré- et post-synaptiques en réponse à une stimulation neuronale (Hartmann et al., 2001; Kohara et al., 2001; Kojima et al., 2001). Ses récepteurs, TrkB, sont également présents dans les deux régions (Drake et al., 1999). De nombreuses études montrent le rôle critique de BDNF dans l'induction de la PLT (Kang and Schuman, 1995; Figueroa et al., 1996; Patterson et al., 1996) en particulier au niveau de la région CA1 (An et al., 2008) mais également dans les processus de mémorisation dépendants de l'hippocampe (Tyler et al., 2002; Yamada and Nabeshima, 2003). Le facteur trophique NGF appartient à la même famille de protéine que BDNF et présente donc des propriétés similaires. Il se fixe préférentiellement aux récepteurs TrkA et son rôle dans les processus de PLT au niveau hippocampique a été démontré dans plusieurs études (Maguire et al., 1999; Hennigan et al., 2009). Par ailleurs, une augmentation de son expression a été associée à une amélioration des performances mnésiques chez l'animal âgé en particulier (Fischer et al., 1991; Woolf et al., 2001).





**Figure 4 : Les mécanismes moléculaires de la potentialisation à long terme (PLT).**

*Source : Bliss and Cooke (2011)*

(A) L'induction de la PLT est déclenchée par l'activation des récepteurs glutamatergiques de type NMDA. Ce récepteur ionotropique détecte la coïncidence de l'activité pré et postsynaptique impliquant la fixation du neurotransmetteur, et la perméabilisation aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ . (B) Le  $\text{Ca}^{2+}$  se lie alors à la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline, qui à son tour vient activer de nombreuses kinases et phosphatases dont CaMKII, PKC et la Calcineurine (PP2B) de façon directe et PKA et PP1 de façon indirecte. L'activité kinase et phosphatase dépend de la concentration et du profil temporel de  $\text{Ca}^{2+}$  postsynaptique. Une transition de  $\text{Ca}^{2+}$  faible et prolongée induira la DLT (dépotentialisation à long-terme) alors qu'une transition brève et forte induira une PLT. (C) La PLT est également exprimée *via* la phosphorylation de récepteur glutamatergique AMPA notamment par la CaMKII. (D) Le trafic des récepteurs AMPA joue un rôle majeur dans l'expression de la PLT en augmentant le nombre de récepteurs à la membrane postsynaptique. (E) Les mécanismes présynaptiques permettent également d'augmenter la libération de neurotransmetteurs et contribuent ainsi à l'expression de la PLT. Ces mécanismes nécessitent l'action de messagers rétrogrades comme l'oxyde nitrique (NO) ou les endocannabinoïdes (EC). (F) La DLT peut également se faire *via* les récepteurs mGluR conduisant à l'activation de la PKC qui en phosphorylant le récepteur AMPA peut réduire sa conductance. (G) Le BDNF joue un rôle complexe dans la PLT et la DLT et contribue de diverses façons à la plasticité à court et à long-terme. (H) La PLT, persistant plus de quelques heures, nécessite la synthèse de nouvelles protéines, soit par le biais de la transcription de nouveaux gènes (I) soit par l'initiation de la traduction locale de transcrits existants. (J) La synthèse de la kinase PKM $\zeta$  permet de maintenir la PLT en maintenant la présence de récepteurs AMPA insérés pendant l'induction de la PLT. L'inhibition de cette kinase peut effacer la PLT et la mémoire de nombreux jours après l'induction. (K) Enfin, le BDNF peut également jouer un second rôle dans la plasticité synaptique, comme un produit nouvellement synthétisé qui modifie la structure de la synapse pour renforcer les changements à long terme.

### ***II.3.2. Neurogenèse hippocampique adulte et processus mnésiques***

La neurogenèse se définit comme l'ensemble des processus conduisant à l'intégration fonctionnelle de néo-neurones dans les circuits cérébraux. Les travaux démontrant l'existence de la formation de nouvelles cellules, à la morphologie similaire à celle des neurones, dans différentes régions du cerveau adulte telles que le GD de la formation hippocampique, le néocortex et le bulbe olfactif datent des années 60 (Altman, 1962). Depuis cette découverte, différentes études ont confirmé le fait que les nouveaux neurones étaient produits tout au long de la vie, et sur la base de données obtenues *in vitro* et au cours du développement, il a été montré que deux types de cellules semblent capables de se diviser : les cellules souches et les cellules progénitrices.

- Les cellules souches sont des cellules indifférenciées, capables de proliférer et de se renouveler en donnant naissance par division asymétrique à une cellule souche identique à elle-même et à une cellule fille plus spécialisée pouvant elle-même donner naissance à différents types cellulaires.
- Les cellules progénitrices sont les progénitures précoces des cellules souches. Elles se différencient de ces dernières de par leur incapacité à se renouveler. En revanche elles sont tout à fait capables de se différencier par division symétrique.

*In vivo*, chez l'adulte il est actuellement très difficile de faire la différence entre les cellules souches et les cellules progénitrices, le terme de précurseur est alors employé pour caractériser ces deux types cellulaires (Aimone et al., 2014).

La neurogenèse hippocampique du cerveau adulte prend son origine dans la zone sous-granulaire du GD. Elle se déroule en trois étapes. Brièvement, les cellules se divisent à plusieurs reprises, au moins pendant les quatre jours qui suivent leur naissance. A l'issue de la prolifération, environ 40% des cellules survivent. Elles migrent ensuite de façon tangentielle vers la couche granulaire où elles vont se différencier pour s'insérer dans le réseau préexistant (Cameron et al., 1993; Dayer et al., 2003; Manns et al., 2011) (**Figure 5**). Il est estimé que les cellules formées chaque jour dans le GD représentent moins de 1% de la population totale des cellules granulaires (Cameron and McKay, 2001; Rao and Shetty, 2004). De plus, seule une faible proportion des néo-neurones produits quotidiennement survit sur le long terme. Plus de 50% des cellules néo-formées vont périr au cours des deux premières semaines de leur vie (Cameron et al., 1993; Gould and Tanapat, 1999; Dayer et al., 2003). Par contre, celles qui

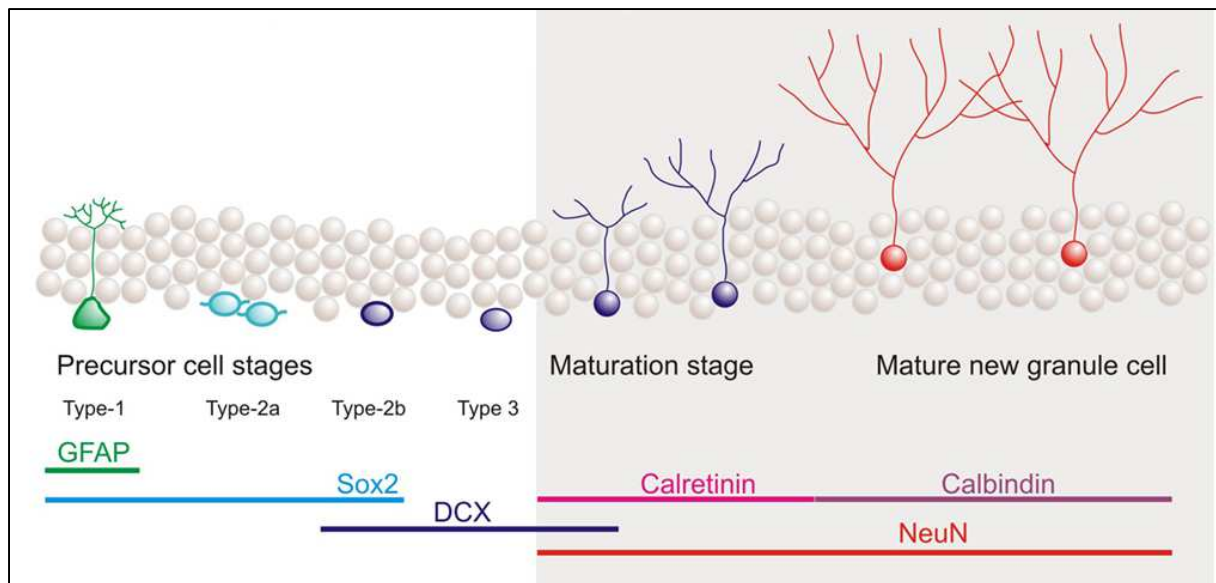
survivent restent stables pendant plusieurs mois (8 à 10 mois) (Dayer et al., 2003; Kempermann et al., 2003) et deviennent majoritairement des neurones granulaires probablement glutamatergiques. Une faible proportion se différencierait en neurones GABAergiques (Liu et al., 2003), en astrocytes ou en microglie (Cameron et al., 1993; Steiner et al., 2004).

La neurogenèse résulte de plusieurs étapes successives :

- La prolifération, est la formation de nouvelles cellules à partir de précurseurs. Elle est étudiée après sacrifice des animaux pour des délais courts (1 à 24h) après l'injection de BrdU (5-bromo-2'-déoxyuridine), un analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN des cellules en division, (Kee et al., 2002) ou encore en utilisant des marqueurs du cycle cellulaire comme le Ki-67 (Scholzen and Gerdes, 2000; Kee et al., 2002), le PCNA (Proliferating Cell Neuronal Antigen) ou l'histone 3 phosphorylée.
- La survie des cellules néoformées est étudiée après sacrifice des animaux à des délais variant de quelques jours à plusieurs mois après l'injection de BrdU.
- La migration et la différenciation des cellules néoformées en cellules matures de phénotype neuronal ou glial peuvent également être évaluées après injection de BrdU.

Il existe plusieurs types de marqueurs cellulaires (**Figure 5**) qui permettent d'évaluer le stade de neurogenèse des cellules (Abrous et al., 2005; Christie and Cameron, 2006; von Bohlen Und Halbach, 2007; Manns et al., 2011).

Ainsi, la Nestine, ou le Msi1 (mouse-Musashi1) sont exprimés spécifiquement dans les précurseurs. La DCX (doublecortine) ou la TuJ1 sont présentes dans les neurones immatures (exprimés précocement au cours de la différenciation). Le NeuN (Neuronal Nuclear) ou la NSE (NeuronSpecificEnolase) sont exprimés spécifiquement dans les neurones matures. Enfin, la GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein), le S100 ou le CNP (2':3'-cyclic-nucleotide 3'- phosphodiesterase) constituent des marqueurs astrocytaires.



**Figure 5 : La neurogenèse hippocampique.**

*Adapté de Manns et al., (2011)*

### ***II.3.3. Neurogenèse et mémoire***

De la même manière que pour la plasticité synaptique, il est aujourd'hui admis que la production de nouveaux neurones granulaires chez l'adulte représente une nouvelle forme de plasticité cérébrale pouvant sous-tendre certaines fonctions mnésiques (Schinder and Gage, 2004; Snyder et al., 2005; Aimone et al., 2006; Leuner et al., 2006; Kitabatake et al., 2007; Drapeau and Nora Abrous, 2008; Deng et al., 2010). En s'intégrant dans le réseau pré-existant, les neurones nouvellement formés contribueraient aux processus de mémorisation hippocampo-dépendants (Dobrossy et al., 2003; Dupret et al., 2008). En effet, ces nouveaux neurones, bien qu'en faible nombre, présentent des propriétés électrophysiologiques propres permettant l'induction de la PLT (Schmidt-Hieber et al., 2004; Overstreet-Wadiche and Westbrook, 2006). Cependant, il faut plusieurs mois pour qu'ils acquièrent une morphologie identique aux cellules granulaires déjà présentes et qu'ils soient intégrés de façon fonctionnelle dans le circuit hippocampique (Ramirez-Amaya et al., 2006; Zhao et al., 2006).

Il existe une relation entre la neurogenèse et la mémoire. En effet, de nombreux travaux suggèrent qu'une amélioration des performances dans des tâches dépendantes de l'hippocampe résulterait d'une augmentation de la neurogenèse hippocampique. Ainsi, des études rapportent que des animaux élevés en environnement enrichi présentent une amélioration de la neurogenèse hippocampique associée à de meilleures performances

mnésiques mesurées dans le labyrinthe aquatique de Morris (Kempermann et al., 1997; 1998; Nilsson et al., 1999). D'autre part, plusieurs travaux dans lesquels la neurogenèse a été manipulée, induite ou inhibée démontrent que les nouveaux neurones adultes hippocampiques sont nécessaires dans différentes tâches de mémoire spatiale dépendantes de l'hippocampe. Ces données montrent également que les nouveaux neurones sont préférentiellement recrutés dans les réseaux hippocampiques codant les informations spatiales et contextuelles, et qu'ils jouent ainsi un rôle crucial dans les processus mnésiques (Clelland et al., 2009; Trouche et al., 2009; Goodman et al., 2010; Nakashiba et al., 2012).

A l'inverse, il semblerait que l'apprentissage spatial soit capable de stimuler la neurogenèse hippocampique mais les résultats à ce sujet restent encore controversés. En effet, alors que certains auteurs mettent en évidence une augmentation de la prolifération cellulaire après une épreuve de mémoire spatiale de référence réalisée dans le labyrinthe aquatique de Morris (Lemaire et al., 2000; Dobrossy et al., 2003), d'autres en revanche, montrent une diminution (Namestkova et al., 2005) ou une absence d'effet sur la neurogenèse (Mohapel et al., 2006). De plus, il semblerait que la mémoire spatiale de travail entraîne quant à elle une diminution du niveau de prolifération cellulaire (Mohapel et al., 2006). Le type de mémoire testé semble donc moduler différemment le niveau de neurogenèse. Par ailleurs, de manière plus précise pour certains auteurs, l'apprentissage stimule la survie cellulaire (Gould and Tanapat, 1999; Ambrogini et al., 2000; Leuner et al., 2004), pour d'autres au contraire, il la diminue (Dobrossy et al., 2003; Ambrogini et al., 2004) ou reste sans effet (Van der Borght et al., 2005). Le type de protocole utilisé dans ces études pourrait également, au moins en partie, expliquer la disparité de ces résultats. Récemment, il a été mis en évidence que le niveau de difficulté du protocole utilisé dans la piscine de Morris (nombre d'essais par session, nombre d'indices) a un impact sur le niveau de survie cellulaire et donc plus largement sur la neurogenèse. Les auteurs ont ainsi montré qu'un niveau de difficulté faible induisait une augmentation de survie cellulaire, tandis qu'un niveau de difficulté élevé provoquait une diminution de la survie des cellules (Epp et al., 2010).

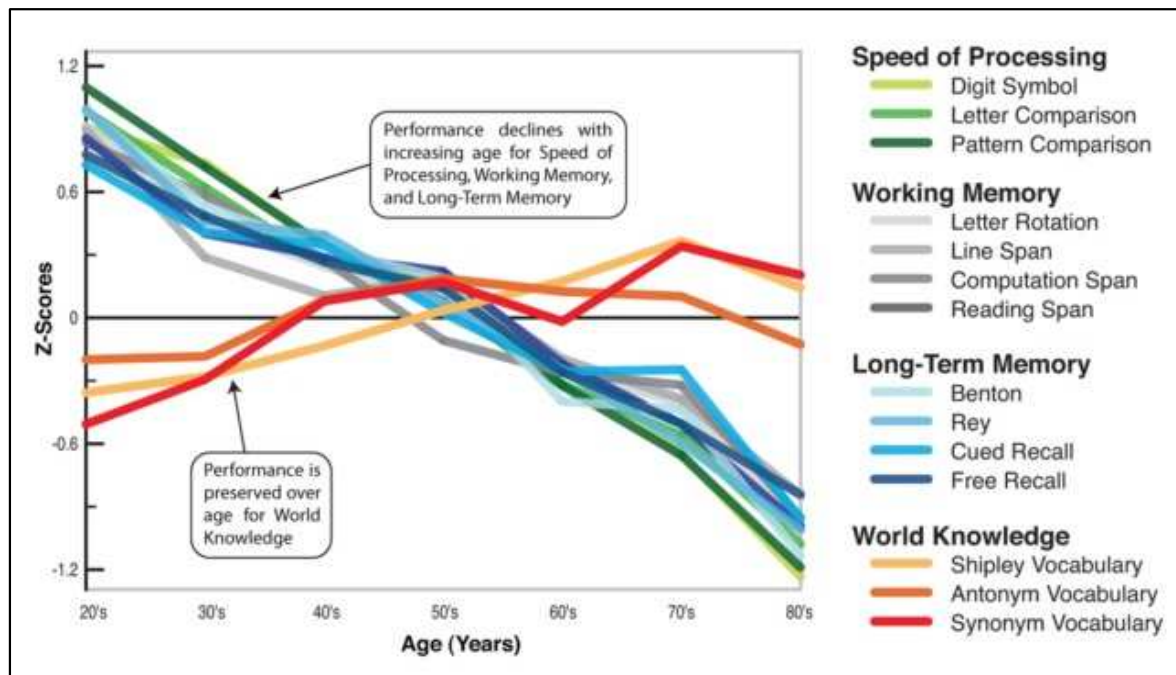
**CHAPITRE III. PROCESSUS MNESIQUES ET ALTERATIONS  
NEUROFONCTIONNELLES AU COURS DU VIEILLISSEMENT**

**III.1. Altérations de la mémoire au cours du vieillissement**

Le vieillissement cognitif se caractérise par une diminution des performances cognitives dans la plupart des domaines de la cognition avec une variabilité importante entre les individus. Cependant toutes les formes de mémoire ne sont pas modifiées de la même manière avec l'âge. Les fonctions exécutives, la mémoire de travail, et la mémoire épisodique font l'objet d'un déclin régulier avec l'âge qui débiterait chez l'adulte encore jeune. A l'inverse, les connaissances (mémoire sémantique), semblent préservées, voire dans certaines études améliorées (Park and Reuter-Lorenz, 2009) (**Figure 6**). La mémoire épisodique est considérée comme la forme de mémoire à long terme qui présente le plus haut degré de déclin lié à l'âge. La mémoire de travail est également réduite dans un âge avancé. Des résultats d'études longitudinales prenant en compte les biais méthodologiques liés au « test-retest » suggèrent que ces deux types de mémoire subiraient un déclin accéléré après 60 ans (Nyberg et al., 2012).

Chez l'animal âgé, les principaux déficits mesurés portent sur des formes de mémoire dites « hippocampo-dépendantes », principalement la mémoire spatiale de référence. Des données expérimentales montrent que les déficits mnésiques liés au vieillissement, sont similaires à ceux induits par des lésions hippocampiques, notamment les déficits d'apprentissage spatial (Murray et al., 1998; Stoelzel et al., 2002). Chez le rat, de nombreuses études ont mis en évidence des déficits liés à l'âge dans différentes tâches permettant d'évaluer la mémoire spatiale (Rosenzweig and Barnes, 2003), en particulier des tâches réalisées dans le labyrinthe aquatique de Morris (Drapeau et al., 2003; Wang et al., 2006). D'autres études menées chez la souris ont également mis en évidence des déficits de la mémoire de travail. Pour exemple, dans une tâche d'alternance spontanée, relevant de l'intégrité de la mémoire spatiale de travail, des souris âgées de 18-19 mois présentaient de moins bonnes performances que leurs congénères jeunes âgées de 4-5 mois (Vandesquille et al., 2011). Par ailleurs, d'autres études ont mis en évidence chez la souris dès 14 mois, des déficits de mémoire contextuelle dans une tâche de discrimination sérielle et contextuelle, par comparaison à des souris âgées de 5 mois (Beracochea et al., 2007; Tronche et al., 2010). Enfin, en utilisant un paradigme modélisant la mémoire déclarative humaine, des auteurs ont montré que les animaux âgés présentent de manière spécifique des déficits de mémoire

relationnelle et de mémoire de travail associés à des altérations de l'activité de l'hippocampe (Etchamendy et al., 2001; Magnusson et al., 2003; Touzani et al., 2003; Mingaud et al., 2008).



**Figure 6 : Illustration du déclin cognitif lors du vieillissement normal chez l'Homme.**

*Source: Park and Reuter-Lorenz (2009)*

La vitesse de traitement de l'information (« speed processing »), la mémoire de travail (« working memory ») et la mémoire à long terme (« long term memory ») déclinent avec l'âge, alors qu'à l'inverse la mémoire des connaissances de type sémantique (« word knowledge ») est préservée.

### III.2. Altérations neurofonctionnelles au cours du vieillissement

Le vieillissement du cerveau se manifeste à plusieurs niveaux :

- Au niveau systémique, il se caractérise par une diminution des facultés d'adaptation, une baisse des capacités d'apprentissage et de mémoire, des états dépressifs, un ralentissement psychomoteur... (Erickson and Barnes, 2003).
- Au niveau anatomique, il est caractérisé par de nombreux changements neurobiologiques observables en imagerie tels qu'une perte d'intégrité de la matière blanche, une diminution de l'épaisseur corticale et du volume de matière grise, mais également par des altérations de l'activité métabolique et de l'activité des neurotransmetteurs (Li and Rieckmann, 2014). Il se manifeste par une perte neuronale, une atrophie cérébrale et une dilatation ventriculaire.

- Au niveau cellulaire, une diminution de la densité de certains récepteurs tels que les récepteurs glutamatergiques NMDA et AMPA (Dickstein et al., 2007) a été observée ainsi qu'une diminution de la libération des neurotransmetteurs, une démyélinisation des fibres nerveuses et une diminution de la densité des épines dendritiques, leur longueur et leur nombre..

### ***III.2.1. Altérations morphologiques***

D'un point de vue anatomique, on peut observer une atrophie cérébrale et une dilatation ventriculaire, ces modifications étant souvent hétérogènes entre les individus (Sullivan et al., 2001). Les altérations cérébrales majeures sont en partie dues à des changements morphologiques au niveau des neurones, tels qu'une réduction de la complexité de l'arborisation dendritique, une diminution de la longueur et du nombre d'épines dendritiques, une baisse de l'expression des récepteurs au glutamate NMDA et AMPA, intervenant dans la mise en place de la PLT (Dickstein et al., 2007). Ces modifications morphologiques se traduisent par des altérations de la plasticité cérébrale et s'accompagnent d'une perte des fonctions cognitives.

### ***III.2.2. Altérations de plasticité cérébrale associées aux déficits mnésiques au cours du vieillissement***

#### ***III.2.2.1. Plasticité synaptique au cours du vieillissement***

Les études menées chez l'Homme comme chez l'animal suggèrent que le vieillissement cérébral s'accompagne d'une réorganisation neuronale principalement dans le cortex préfrontal et la région hippocampique (Burke and Barnes, 2006). Ainsi, il a été montré que le vieillissement entraîne des déficits de PLT, corrélés avec des déficits mnésiques observés dans des tâches évaluant la mémoire spatiale (Rosenzweig and Barnes, 2003).

Certaines études ont montré que des changements structuraux au niveau de l'hippocampe, impliquant des pertes synaptiques associées à des modifications de la concentration de certains marqueurs synaptiques, sont à l'origine des altérations de plasticité synaptique observées au cours du vieillissement et contribuent à l'apparition des déficits de PLT et des déficits cognitifs (Selkoe, 2002; Salehi et al., 2003; Coleman, 2005; Burke and Barnes, 2006; 2010). En effet, une diminution d'environ 30% du nombre de synapses a été observée dans le GD de rats âgés, de manière concomitante à une baisse de leurs performances de mémoire spatiale (Bondareff and Geinisman, 1976; Geinisman et al., 1977;



Geinisman et al., 1986; Geinisman et al., 1992). Une diminution du nombre d'épines dendritiques et de leur longueur a également été décrite dans les neurones du GD, associée à des déficits cognitifs hippocampo-dépendants (von Bohlen Und Halbach, 2007).

De plus, la signalisation calcique semble elle aussi altérée par l'âge. En effet, une augmentation de la conductance du Ca<sup>2+</sup> conduisant à des modifications de l'homéostasie calcique et par conséquent à des altérations de plasticité synaptique a été mise en évidence dans les neurones d'animaux âgés (Landfield, 1988; Thibault and Landfield, 1996; Foster and Norris, 1997; Rosenzweig and Barnes, 2003; Toescu et al., 2004).

Parmi les facteurs situés en aval du signal calcique, d'autres voies de signalisation telle que celle des MAP kinases sont affectées par le vieillissement. A ce niveau, il est important de préciser que l'encodage d'une nouvelle information engendre une cascade d'évènements moléculaires aboutissant à la synthèse de nouvelles protéines qui permettront alors des modifications cellulaires durables, s'inscrivant dans les processus de plasticité synaptique des réseaux neuronaux activés (Wang et al., 2006). L'une des voies de signalisation les plus impliquées dans ces mécanismes de plasticité, est la voie des MAP kinases (Mitogen-activated protein kinases) ERK (Extracellular signal regulated kinase) et du facteur de transcription CREB (cAMP-response element-binding protein). C'est en effet une voie ubiquitaire très conservée au cours de l'évolution et qui constitue un point de convergence de nombreuses autres voies pour le déclenchement de processus à long terme (Weeber and Sweatt, 2002). L'activation de cette voie joue donc un rôle crucial dans la formation de la mémoire à long terme, notamment en initiant la transcription de gènes précoces tels que c-fos (Carlezon et al., 2005). Cependant, de nombreuses études ont montré que le vieillissement est accompagné d'une altération de cette voie. En effet, Simonyi et al. (2003) ont montré une réduction de 20% de l'expression des transcrits de ERK1 dans la région CA3 hippocampique de rats âgés de 13 mois par comparaison à des rats âgés de 3 mois (Simonyi et al., 2003). Des souris âgées de 23-24 mois présentent une réduction de l'activation de CREB dans leur hippocampe par comparaison à des souris adultes de 5-6 mois, corrélée à de faibles performances de mémoire spatiale, mesurées dans le labyrinthe aquatique de Morris (Porte et al., 2008).

D'autre part, certaines protéines synaptiques ont été particulièrement étudiées chez l'animal âgé, telles que les récepteurs NMDA impliqués dans les processus de PLT (Magnusson et al., 2007; Topic et al., 2007), mais également la synaptophysine, la

neurogranine (RC3) ou encore la neuromoduline (GAP-43). Ainsi une diminution d'expression de l'expression de RC3 et GAP-43 intervient au cours du vieillissement (Casoli et al., 2001; Etchamendy et al., 2001; Feart et al., 2005; Boucheron et al., 2006) ; cette diminution de RC3 étant associée à des déficits de PLT et de mémoire spatiale (Etchamendy et al., 2001).

Enfin, l'excitabilité neuronale et la transmission synaptique lors de tâches comportementales hippocampo-dépendantes apparaissent diminuées au cours du vieillissement. Ces déficits concernent à la fois les voies glutamatergiques et cholinergiques qui représentent les principaux systèmes excitateurs dans la communication neuronale hippocampique. Il a ainsi été démontré que les animaux âgés présentent des déficits mnésiques concomitants à une dégénérescence des neurones cholinergiques et une perturbation de la voie de signalisation du NGF, impliquée dans la survie de ces neurones (Williams et al., 2006).

### *III.2.2.2. Neurogenèse au cours du vieillissement*

Bien que la neurogenèse hippocampique persiste au cours du vieillissement, une diminution importante de la production de nouveaux neurones a été mise en évidence dans le GD d'animaux âgés (Abrous et al., 2005). Par conséquent, le déclin de neurogenèse observé chez les animaux âgés pourrait participer au déclin des fonctions cognitives. Cependant, la relation potentielle entre certaines étapes de la neurogenèse et les performances mnésiques des animaux âgés reste à préciser. Toutefois, une diminution de neurogenèse hippocampique a été associée à des déficits cognitifs lors d'une épreuve spatiale dans le labyrinthe aquatique de Morris au cours du vieillissement (Kempermann et al., 1998; Driscoll et al., 2006). De plus, il a été montré que la neurogenèse était altérée dans des modèles de vieillissement pathologique dans lesquels l'apparition des déficits cognitifs liées à l'âge est accélérée (Vallee et al., 1999) et la neurogenèse hippocampique diminuée (Lemaire et al., 2000).

Enfin, d'autres travaux plus récents suggèrent l'existence d'une relation quantitative entre le nombre de neurones nouvellement formés et les performances spatiales au cours du vieillissement. Ainsi, les animaux âgés qui présentent de bonnes performances dans le labyrinthe aquatique sont également ceux dont le nombre de neurones néo-formés est le plus important (Drapeau et al., 2003). Ces données restent toutefois controversées puisque, d'autres études ne révèlent aucun lien entre neurogenèse et capacités mnésiques au cours du vieillissement (Bizon and Gallagher, 2003; Merrill et al., 2003), ou indiquent même des

corrélations négatives entre le niveau de survie cellulaire et les capacités mnésiques des animaux âgés (Bizon et al., 2004). Par conséquent, le lien précis existant entre les processus de neurogenèse et les performances mnésiques chez l'animal âgé reste encore à élucider.

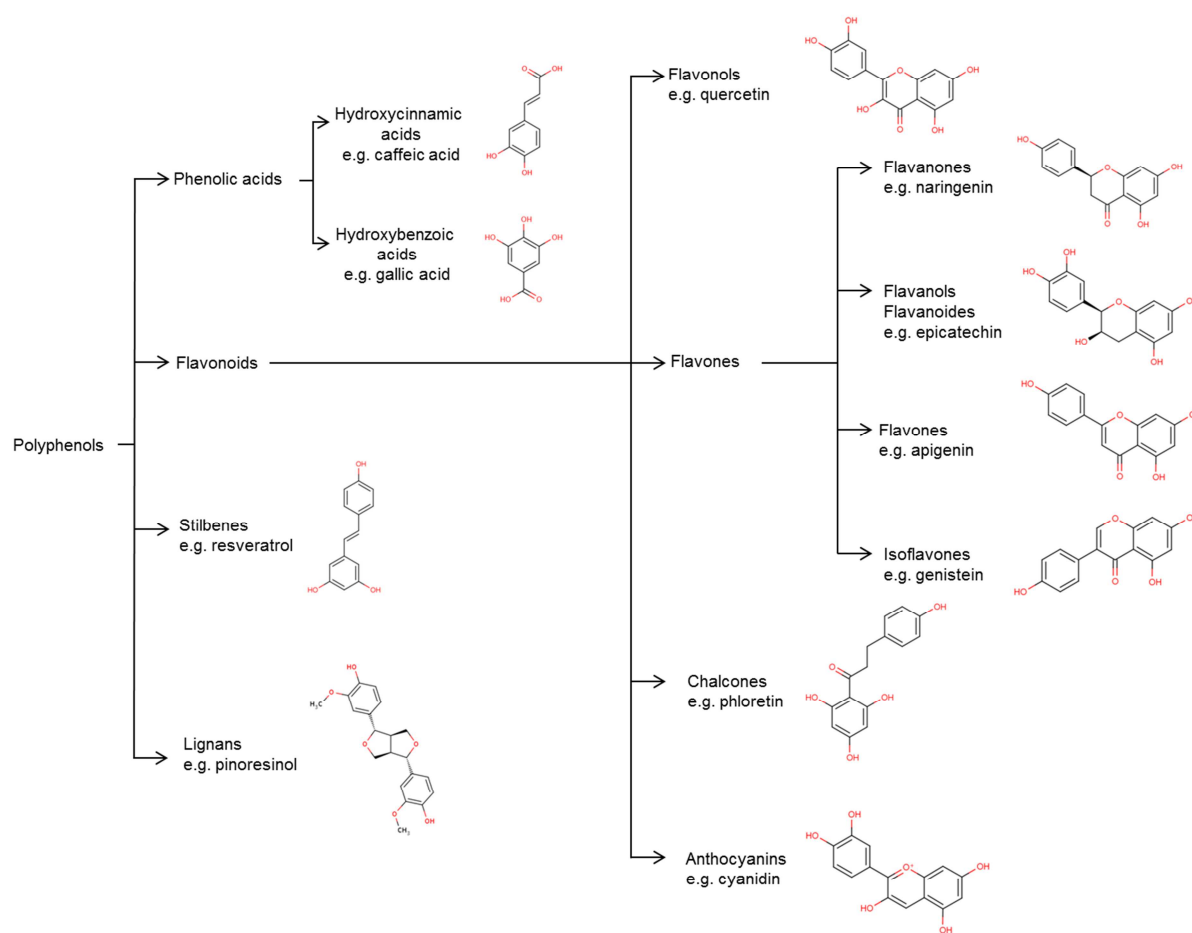
L'identification de facteurs susceptibles de stimuler la neurogenèse chez le sujet âgé dans le but d'améliorer leurs performances mnésiques, a fait l'objet d'un certain nombre d'études. Ainsi, une exposition de 2 mois à un environnement enrichi induit une amélioration significative des capacités mnésiques accompagnée d'une augmentation de la différenciation neuronale chez la souris âgée (Kempermann et al., 1998). D'autre part, certains facteurs neurobiologiques sont également susceptibles de moduler ces processus de neurogenèse. En effet, le BDNF semble capable de stimuler la différenciation neuronale dans l'hippocampe de rats adultes (Scharfman et al., 2005). Or, au cours du vieillissement, il a été observé une diminution d'expression du BDNF concomitante à celle des récepteurs TrkB sur lesquels ces facteurs vont se fixer afin de contribuer à la transduction des signaux intracellulaires (Silhol et al., 2005). Enfin, une corrélation a été mise en évidence entre le niveau d'expression du BDNF et les performances mnésiques du sujet âgé (Schaaf et al., 2001).

Ces données suggèrent que des altérations de neurogenèse hippocampique pourraient contribuer à certains déficits cognitifs liés au vieillissement. C'est pourquoi, il est envisageable qu'une intervention *via* certains facteurs neurobiologiques impliqués dans les processus de neurogenèse, permettrait de compenser ces déficits.

## CHAPITRE IV. POLYPHENOLS, MEMOIRE ET VIEILLISSEMENT CEREBRAL

## IV.1. Classification des polyphénols, structure chimique et source alimentaire

Les polyphénols sont des composés phytochimiques, considérés aujourd'hui comme des micronutriments essentiels, uniquement présents dans les produits alimentaires d'origine végétale. Les polyphénols peuvent être classifiés en plusieurs catégories en fonction de leurs structures (Spencer et al., 2008) (**Figure 7**).



**Figure 7 : Classification et structures chimiques des principales classes de polyphénols.**

*Adapté de Spencer et al., (2008)*

Les quatre principales familles sont les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stilbènes et les lignans (Manach et al., 2004). Les flavonoïdes représentent le principal groupe de polyphénols car ils sont les plus représentés dans l'alimentation humaine. Les flavonoïdes sont constitués d'une structure commune de deux noyaux aromatiques liés par trois atomes de

carbone qui forment un hétérocycle oxygéné (C6-C3-C6). D'après le profil de l'hydroxylation de l'hétérocycle oxygéné et la disposition des groupes hydroxyle, les flavonoïdes peuvent être divisées en quatre sous-groupes: 1) les flavonols présents dans les oignons, le brocoli et le chocolat, 2) les flavones, 3) les chalcones présents dans la pomme, et 4) les anthocyanines, que l'on trouve dans le bleuet, les fraises, le vin rouge et le haricot commun. De plus, les flavones peuvent être divisés en quatre autres sous-classes: i) les flavanones présents dans les agrumes ou l'origan, ii) les flavanols, abondants dans le thé vert, le vin rouge et le chocolat, iii) les flavones retrouvés dans le persil, le céleri ou d'olive, et iv) les isoflavones présents principalement dans le soja. Les flavanols peuvent être polymérisés pour créer des flavanoïdes également appelés tanins (proanthocyanidines). Les acides phénoliques peuvent être classifiés en dérivés de l'acide benzoïque (C6-C1,2), que l'on trouve dans les framboises, le vin rouge ou le thé noir et de façon importante dans les noix, comme les châtaignes, et en dérivés de l'acide cinnamique (C6-C3) présents dans le vin rouge, les prunes ou les olives. Les stilbènes sont quant à eux composés de deux cycles aromatiques liés par un pont méthylène et peuvent être trouvés sous forme *cis* et *trans* ayant des propriétés biologiques et chimiques différentes. Des inter-conversions *trans/cis* sont observées avec la chaleur ou les UV. Le resvératrol peut également être retrouvé sous formes de dimères ou trimères comme les viniferines présentes dans le vin rouge. Les stilbènes sont également présents dans les airelles et les canneberges. Les composés phénoliques comprennent également des lignans, caractérisés par une structure 1,4-diarylbutane qui sont des précurseurs de polymères pariétaux végétaux constituant des facteurs de défense contre les agents pathogènes. Ils sont trouvés dans l'huile d'olive et dans les graines et l'huile de sésame (pour référence voir (Collin and Crouzet, 2011) et (Phenol-Explorer)).

### IV.2. Apports alimentaires en polyphénols

Seules quelques informations partielles sont disponibles quant aux quantités de polyphénols qui sont consommés quotidiennement dans le monde. Ces données ont été obtenues grâce à l'analyse des principaux aglycones (après hydrolyse de leurs glycosides et esters) dans les aliments les plus consommés par l'Homme.

En 1976, Kuhnau (1976) a calculé que la consommation alimentaire de flavonoïdes aux États-Unis était d'environ 1g/j et se composait des éléments suivants: 16% de flavonols, flavones et flavanones; 17% d'anthocyanines; 20% de catéchines; et 45% "biflavones" (Kuhnau, 1976). Bien que ces chiffres aient été obtenus dans des conditions peu détaillées, ils

continuent à servir de données de référence (Scalbert and Williamson, 2000; Manach et al., 2004). Une étude a montré que la consommation de flavonoïdes totaux ne variait pas significativement entre les régimes dits Méditerranéens (MED) (370,2 mg/d) et non-Méditerranéens (non-MED) (373,7 mg/d) mais que les classes de flavonoïdes consommés et leur source variaient entre les pays MED et non-MED. Dans les régions non-MED, les principaux polyphénols consommés sont les proanthocyanidines (48,2%) et les monomères de flavan-3-ol (24,9%) avec pour principales sources le thé (25,7%) et les fruits (32,8%). Dans les régions MED, les proanthocyanidines sont de loin les plus consommées (59,0%) *via* les fruits (55,1%), les vins (16,7%) et le thé (6,8%) (Zamora-Ros et al., 2013). Certaines études ont également apporté des données individuelles plus précises sur l'apport alimentaire des différentes classes de polyphénols.

Les flavonols ont été plus largement étudiés. La consommation de ces substances a été estimée à  $\approx$  20-25 mg/j aux États-Unis, au Danemark et en Hollande (Hertog et al., 1993; Justesen et al., 1997; Sampson et al., 2002). En Italie, la consommation varierait de 5 à 125 mg/j, avec une valeur moyenne de 35 mg/j (Manach et al., 2004). L'apport de flavanones est similaire ou éventuellement supérieure à celle des flavonols, avec une consommation moyenne de hespéridine de 28,3 mg/j en Finlande (Manach et al., 2004). Parce que les agrumes sont pratiquement la seule source de flavanones, l'ingestion de ces substances est probablement plus importante dans les régions où ces fruits sont produits, tels que l'Europe du Sud. La consommation d'anthocyanes a été étudiée seulement en Finlande, où de grandes quantités de baies sont consommées, et a été estimée à 82 mg/j en moyenne, bien que certains apports dépasseraient 200 mg/j (Manach et al., 2004).

La consommation de soja dans les pays asiatiques est de  $\approx$  10-35 g/j, ce qui équivaut à une consommation moyenne de 25-40 mg d'isoflavones par jour, avec une dose maximale de 100 mg/j (Adlercreutz et al., 1991; Kimira et al., 1998) (Coward et al., 1993). Les américains et les européens, qui mangent peu de soja, ne consomment que quelques milligrammes d'isoflavones par jour. Néanmoins, l'incorporation de quantités croissantes d'extraits de soja dans les produits alimentaires manufacturés pourrait entraîner une augmentation de l'apport en isoflavones. Les femmes ménopausées qui reçoivent un traitement hormonal de substitution sous forme de phytoestrogènes consomment entre 30 et 70 mg d'isoflavones /j sous la forme de capsules d'extrait de soja (Bennetau-Pelissero, 2001).

En Espagne, la consommation totale de catéchines et de dimères et trimères de proanthocyanidines a été estimée à 18-31 mg/j, et les principales sources sont les pommes, les poires, les raisins et le vin rouge (Manach et al., 2004). L'ingestion de proanthocyanidines (PA) plus fortement polymérisées pourrait être supérieure à plusieurs centaines de milligrammes par jour comme suggéré précédemment (Santos-Buelga and Scalbert, 2000), mais il n'y a toujours pas de données fiables. Une étude récente a rapporté des informations détaillées sur la consommation alimentaire habituelle de monomères de flavane-3-ol, de proanthocyanidines et de theaflavins chez les adultes âgés de 18 à 64 ans. Cette étude fournit des données importantes sur la consommation de flavanols dans l'Union Européenne (UE) et démontre que les apports alimentaires en monomères flavan-3-ol, en PA et en theaflavins varient considérablement selon les pays européens. En outre, la consommation habituelle moyenne de flavan-3-ols est nettement inférieure aux quantités utilisées dans la plupart des études d'intervention nutritionnelle (Vogiatzoglou et al., 2013).

La consommation d'acides hydroxycinnamiques peut varier fortement en fonction de la consommation de café. Certaines personnes qui boivent plusieurs tasses par jour peuvent ingérer jusqu'à 500-800 mg/j d'acide hydroxycinnamique, alors que les sujets qui ne boivent pas de café et qui mangent de petites quantités de fruits et légumes n'ingèrent pas plus de 25 mg/j (Clifford, 2000). Une étude allemande a estimé la consommation quotidienne d'acides hydroxycinnamiques et acides hydroxybenzoïques à 211 et 11 mg/j, respectivement. L'apport en acide caféique seul était de 206 mg/j, et les principales sources étaient le café (qui fournit 92% de l'acide caféique) et les fruits et jus de fruits combinés (source de 59% d'acide p-coumarique) (Radtke et al., 1998).

Divers auteurs ont noté une grande variabilité de l'apport alimentaire en polyphénols. La consommation d'acides phénoliques variait de 6 à 987 mg/j en Allemagne (Radtke et al., 1998). La consommation moyenne de flavonols et flavones dans la population néerlandaise était de 23 mg/j; les valeurs aux 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> percentiles étaient 4 et 46 mg/j, respectivement; et certains sujets ont consommé jusqu'à 100 mg/j (Hertog et al., 1993). La raison principale de ces variations est la préférence alimentaire individuelle. Lorsque la teneur en polyphénols est exprimée en quantité fournie par une portion de nourriture, la consommation d'un aliment en particulier, comme les baies pour les anthocyanines ou le café pour les acides hydroxycinnamiques, apparaît clairement capable de changer considérablement l'apport en polyphénols totaux. Si on considère les valeurs moyennes, la somme des apports en flavonols, flavanones, flavanols (monomères, dimères, et trimères), et d'isoflavones consolide une

consommation quotidienne totale de 100-150 mg dans les populations occidentales, à laquelle il faut ajouter la consommation extrêmement variable d'acides hydroxycinnamiques, d'anthocyanes et de proanthocyanidines. Enfin, l'apport en polyphénols totaux atteint probablement 1 g/j chez les personnes qui mangent plusieurs portions de fruits et légumes par jour. Notez qu'il est vraiment difficile de suivre un régime totalement exempt de polyphénols. Comme l'apport en polyphénols est difficile à évaluer à l'aide de questionnaires alimentaires, car les contenus de certains des principaux polyphénols dans les aliments ne sont pas connus, la validation de biomarqueurs d'exposition aux polyphénols tels que le dosage des métabolites urinaires par exemple, seraient très utiles. Quelques études ont tenté de corréler les consommations de flavonols, flavanones, et d'isoflavones avec les concentrations plasmatiques ou l'excrétion urinaire de métabolites (Seow et al., 1998; Chen et al., 1999; Noroozi et al., 2000; Atkinson et al., 2002; Erlund et al., 2002; Radtke et al., 2002), mais il n'y a pas encore de méthode fiable de quantification dans des échantillons d'urine ou de plasma qui pourraient permettre d'évaluer la consommation à long terme des différents polyphénols.

### **IV.3. Biodisponibilité des polyphénols**

Il est important de souligner que les polyphénols qui sont les plus courants dans l'alimentation humaine n'apparaissent pas nécessairement comme les plus actifs dans l'organisme, soit parce qu'ils ont une activité intrinsèque plus faible, soit parce qu'ils sont mal absorbés par l'intestin, hautement métabolisés ou rapidement éliminés. En outre, les métabolites que l'on trouve dans le sang et les organes cibles et qui résultent de l'activité digestive ou hépatique peuvent avoir une activité biologique différente de leurs composés d'origine. Une connaissance approfondie de la biodisponibilité des polyphénols est donc essentielle pour mieux comprendre leurs effets sur la santé.

La structure chimique des polyphénols détermine le taux et l'étendue de leur absorption intestinale et la nature de leurs métabolites circulant dans le plasma. L'absorption et le métabolisme des différents polyphénols se produit par l'intermédiaire d'une voie commune (Scalbert and Williamson, 2000). Les aglycones peuvent être absorbés par l'intestin grêle. Cependant, la plupart des polyphénols sont présents dans la nourriture sous forme d'esters, de glycosides, ou de polymères qui ne peuvent pas être absorbés dans leur forme native. Ces substances doivent être hydrolysées par les enzymes intestinales ou par la microflore colique avant de pouvoir être absorbés. Lorsque la flore est impliquée, l'efficacité



d'absorption est souvent réduite car la flore dégrade également les aglycones ce qui produit divers acides aromatiques simples. Au cours de l'absorption, les polyphénols sont conjugués dans l'intestin grêle et plus tard dans le foie. Ce processus comprend principalement la méthylation, la sulfatation et la glucuronidation. La conjugaison est un processus de détoxification métabolique commune à de nombreux xénobiotiques qui limite leurs effets toxiques potentiels et facilite leur élimination biliaire et urinaire en augmentant leur caractère hydrophile. Les mécanismes de conjugaison sont très efficaces, et les aglycones sont généralement absents dans le sang ou présents en faibles concentrations après la consommation à des doses nutritionnelles. Les polyphénols circulants sont donc des dérivés conjugués qui sont transportés sous forme liés à l'albumine. Les polyphénols sont capables de pénétrer les tissus, en particulier ceux dans lesquels ils sont métabolisés, mais leur capacité à s'accumuler dans les tissus cibles spécifiques nécessite d'être plus étudiée. Les polyphénols et leurs dérivés sont éliminés principalement dans l'urine et la bile. Les polyphénols sont sécrétés par la voie biliaire dans le duodénum, où ils sont soumis à l'action d'enzymes bactériennes, en particulier la  $\beta$ -glucuronidase, et dans les segments distaux de l'intestin, après quoi ils peuvent être réabsorbés. Ce recyclage entéro-hépatique peut conduire à une présence plus longue des polyphénols dans le corps (Scalbert et al., 2002; Manach et al., 2004).

#### **IV.4. Biodisponibilité cérébrale**

Afin de comprendre si les polyphénols et leurs dérivés métaboliques sont capables d'effets neuroprotecteurs directs, il est important de savoir s'ils sont en mesure d'accéder au système nerveux central. Pour que les polyphénols puissent entrer dans le cerveau, ils doivent d'abord traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE). Même s'il ne semble pas totalement admis que les polyphénols pénètrent dans le cerveau, il existe certaines études qui mettent en évidence la présence de polyphénols dans le tissu cérébral après ingestion orale.

Ainsi, certains flavanols peuvent être retrouvés dans le cerveau de rat sous forme de métabolites de catéchine et d'épicatéchine (Abd El Mohsen et al., 2002; van Praag et al., 2007; Williams et al., 2008; Ferruzzi et al., 2009; Prasain et al., 2009). Youdim et al. ont observé que certains flavonoïdes dont certaines anthocyanes alimentaires, comme la cyanidine-3-rutinoside et la pélagonidine-3-glucoside, pouvaient pénétrer la BHE dans des modèles *in vitro* et *in situ* (Youdim et al., 2004). De plus, les anthocyanes ont également été détectées dans différentes régions du cerveau de rats (Passamonti et al., 2005) et de porcs nourris avec des bleuets (Kalt et al., 2008; Milbury and Kalt, 2010). Andres-Lacueva et al. ont détecté des traces de plusieurs anthocyanes dans le cerveau des rats qui avaient reçu, pour une

période de 10 semaines, un régime supplémenté avec un extrait de bleuet, contenant des quantités indéfinies d'anthocyanes (Andres-Lacueva et al., 2005). Dans un délai beaucoup plus court, 18h après la consommation de pélagronidine par gavage à une dose de 50mg/kg de poids corporel, des anthocyanidines non métabolisées ont été détectées dans le cerveau de rats, à une concentration de 0,2nmol/g (poids frais) (El Mohsen et al., 2006). De manière semblable, chez le porc supplémenté 4 semaines avec un extrait de bleuet, contenant des quantités non définies d'anthocyanes, 300pg /g ont été détectés dans les tissus du cervelet et 700pg/g dans les tissus de l'œil (Kalt et al., 2008). En revanche, les anthocyanes ne s'accumulent pas en quantités détectables dans le cerveau de rats 24 h après une supplémentation aiguë par gavage avec 2,8 ml de jus de framboise, qui est une dose nutritionnelle pertinente équivalente à un 700ml de jus chez un Homme de 70 kg (Borges et al., 2007). De plus, plusieurs rapports ont confirmé que le resvératrol administré par voie orale peut être absorbé par l'organisme et traverser la BHE puis être incorporé dans le cerveau (Asensi et al., 2002; Wang et al., 2002; Abd El-Mohsen et al., 2006; Juan et al., 2010).

### **IV.5. Polyphénols, mémoire et vieillissement**

Le vieillissement est bien connu pour conduire à des troubles cognitifs et des troubles neurologiques (Joseph et al., 2005). Ces déficits sont amplifiés dans les maladies neurodégénératives liées à l'âge telles que la maladie d'Alzheimer et participent à la genèse d'états de dépendance des personnes. Comme la population âgée augmente, il en va de même de la prévalence de ces troubles liés à l'âge et le coût pour les sociétés occidentales à fort développement est aujourd'hui extrêmement élevé (Evans et al., 1989; Esposito et al., 2002; Nicita-Mauro, 2002). Afin d'améliorer la qualité de vie et le bien être des personnes âgées et ainsi alléger le fardeau économique engendré par la dépendance, il semble important de développer des stratégies permettant de corriger, ou au moins ralentir le déclin cognitif lié à l'âge et ce afin de différer l'apparition des pathologies neurodégénératives. Dans ce contexte, une stratégie de nutrition préventive pourrait permettre d'éviter ou de retarder l'évolution vers la démence et de favoriser ainsi le maintien d'un état cognitif stable et un bien être satisfaisant chez les sujets âgés. Ces dernières années, les recherches dédiées à la compréhension des relations entre la nutrition et le « bien vieillir » se sont multipliées. Parmi les aliments susceptibles de protéger des maladies dégénératives liées au vieillissement, les fruits et légumes riches en polyphénols apparaissent comme des candidats de choix pour retarder les déficits physiologiques et fonctionnels liées à l'âge (Joseph et al., 2005; Gomez-Pinilla, 2008; Queen and Tollefsbol, 2010).

Il a été montré que les polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes peuvent améliorer les fonctions cognitives telles que l'apprentissage et la mémoire et pourraient ainsi permettre de prévenir le déclin cognitif lié à l'âge chez les animaux (Haque et al., 2006; Kaur et al., 2008; Shukitt-Hale et al., 2008; Williams et al., 2008) et l'Homme (Letenneur, 2004; Andres-Lacueva et al., 2005; Dinges, 2006; Letenneur et al., 2007; Krikorian et al., 2010a ; Krikorian et al., 2010b; Krikorian et al., 2012). Les mécanismes d'action des flavonoïdes restent vagues, mais on sait qu'ils sont capables de moduler les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans l'apprentissage et la mémoire. Le resvératrol, de la famille de stilbènes, est également dans la liste des actifs nutritionnels efficaces. D'abord étudié pour sa présence dans le vin rouge et son lien avec le « French paradox » (Sun et al., 2002), le resvératrol a ensuite suscité l'intérêt des scientifiques pour ses capacités, semblables à celles de la restriction calorique, à prolonger la durée de vie mais surtout à améliorer les fonctions cognitives et à retarder les troubles cognitifs liés à l'âge (Valenzano et al., 2006; Barger et al., 2008; Pearson et al., 2008; Agarwal and Baur, 2011; Dal-Pan et al., 2011b; Harada et al., 2011). Toutes ces données suggèrent qu'une supplémentation en polyphénols par voie nutritionnelle pourrait permettre de prévenir les altérations mnésiques liées à l'âge.

Dans la suite de cet exposé, nous nous concentrerons sur les polyphénols de baies présents dans l'extrait Neurophenol® pour leur intérêt dans la prévention du déclin cognitif lié à l'âge. Ainsi, nous résumerons les connaissances actuelles sur les flavanols tels que les catéchines et épicatechines et leurs oligomères, les proanthocyanidines, que l'on trouve dans le raisin, les anthocyanes étudiées principalement en lien avec le bleuet et le raisin, et enfin nous nous concentrerons sur un stilbène particulier, le resvératrol connu pour être présent dans le raisin et auquel la communauté des chercheurs s'est beaucoup intéressée au cours des dernières années.

### ***IV.5.1. Effets des baies sur le déclin cognitif lié à l'âge***

La plupart des études sur les baies et le déclin cognitif lié à l'âge sont réalisées sur certaines baies riches en antioxydants telles que les bleuets, les myrtilles, les fraises ou encore le raisin. Les bleuets, contenant de grandes quantités de polyphénols, possèdent une plus grande capacité anti-oxydante que la plupart des autres fruits et légumes (Prior et al., 1998). Un grand nombre d'études ont rapporté que la consommation de bleuets pourrait retarder les déficits physiologiques et fonctionnels liés à l'âge. Ainsi, la consommation quotidienne de jus de bleuet pendant 12 semaines induit une amélioration des performances de mémoire

épisodique chez des personnes âgées (moyenne d'âge : 76,2 ans) (Krikorian et al., 2010b). En cohérence avec ces résultats, des travaux menés sur des rats âgés rapportent aussi des effets bénéfiques du bleuet sur les performances de mémoire et motrices se traduisant par une atténuation du déclin de la mémoire évaluée dans un test de reconnaissance d'objets et de la mémoire spatiale de travail (Goyarzu et al., 2004; Williams et al., 2008). D'un point de vue plus mécanistique, un régime enrichi en bleuet administré à des rats très âgés (24 mois) comparés à des jeunes, normalise le niveau de la PLT dépendante du récepteur NMDA dans leur hippocampe. Celle-ci est largement reconnue comme étant un corrélat cellulaire de la formation de la mémoire, et ce résultat suggère une normalisation concomitante de la plasticité synaptique par le régime (Coultrap et al., 2008). Une étude plus récente sur un modèle de souris à sénescence accélérée propose aussi que les effets bénéfiques du bleuet sur le déclin cognitif pourraient être dus à une augmentation de l'expression hippocampique de ERK phosphorylée. Les auteurs suggèrent également que cet effet promnésiant des polyphénols du bleuet serait dû à leur activité anti-oxydante liée à leur capacité à activer la superoxyde dismutase et à réduire la teneur en malondialdéhyde (Tan et al., 2014). Cependant, il semble que l'impact des extraits de bleuet sur les performances mnésiques mette en jeu bien d'autres mécanismes que leur action anti-oxydante. Ainsi un régime enrichi en extrait de bleuet induit une diminution significative du niveau cérébral de NF-kB chez des rats âgés comparés aux contrôles (Goyarzu et al., 2004). Ce niveau cérébral de NF-kB est significativement plus élevé chez les rats âgés que chez les rats jeunes (Joseph et al., 1999). Ces résultats sont en accord avec l'effet connu des flavonoïdes sur la signalisation cellulaire, notamment sur l'activité de NF-kB (Dias et al., 2005; Martinez-Florez et al., 2005). Les études sur les fraises mettent en évidence une haute activité anti-oxydante et anti-inflammatoire de ces fruits, susceptibles de prévenir l'apparition d'altérations neurobiologiques et comportementales liées au vieillissement. Ainsi, une supplémentation avec de la fraise prévient les effets de l'âge sur la transduction du signal neuronal et améliore les processus mnésiques chez les rats âgés (Joseph et al., 1998; Joseph et al., 1999) ou dans un modèle de rat à vieillissement accéléré (Shukitt-Hale et al., 2007). Le raisin est une baie très intéressante car elle est riche en flavonoïdes parmi lesquels les catéchines, épicatechines, quercétines mais également anthocyanes et proanthocyanidines reconnus comme étant de puissants antioxydants. Au cours des dernières années, le concept de « French paradox » a suscité un regain d'intérêt pour les polyphénols du raisin vis à vis de leur potentiel bénéfique pour la santé humaine, y compris la santé cérébrale. En effet, la faible prévalence des maladies coronariennes en France comparées aux autres pays occidentaux a ouvert un champ de

questions et l'hypothèse du rôle protecteur de l'oxydation des polyphénols contenus dans les vins rouges a été émise et largement étudiée depuis. *De facto*, les propriétés nutritionnelles du raisin en tant que source des polyphénols du vin font également l'objet de nombreuses études. Ainsi, de manière semblable aux résultats obtenus avec le jus de bleuets, la consommation pendant 12 semaines de jus de raisin Concord conduit à une amélioration des performances de mémoire chez des sujets âgés (Krikorian et al., 2010a). Un effet comparable a été obtenu chez les rats âgés avec une supplémentation en jus de raisin Concord (Shukitt-Hale et al., 2006). Des extraits spécifiques issus de baies (extrait de pépins de raisin par exemple) sont les plus couramment utilisés pour les interventions nutritionnelles car ils sont très concentrés en polyphénols notamment en flavanols, anthocyanines ou resvératrol. Ces études permettent de réaliser des supplémentation nutritionnelles avec une plus grande quantité de polyphénols que n'en apportent les fruits ou jus de fruits eux-mêmes et ceci facilite la mise en évidence des effets fonctionnels et comportementaux et l'étude des mécanismes neurobiologiques sous-jacents. Plus récemment, des effets bénéfiques des mûres (blackberry and mulberry) sur les déficits de mémoire lié à l'âge, mais également sur les comportements moteur ont été mis en évidence chez les rats âgés (Shukitt-Hale et al., 2009) ainsi que chez des souris à sénescence accélérée (Shih et al., 2010).

### ***IV.5.2. Flavanols: effets sur le déclin cognitif lié à l'âge***

Une étude récente a rapporté des informations détaillées sur la consommation alimentaire habituelle de flavanols, et en particulier de monomères de flavan-3-ol, de proanthocyanidines et theaflavins chez des sujets adultes âgés de 18 à 64 ans. Cette étude fournit des données importantes sur la consommation de flavanols dans l'UE et démontre que les apports alimentaires en monomères de flavan-3-ol, PA et theaflavins varient considérablement selon les pays européens (de 181 mg/j à 793 mg/j). De plus, la consommation habituelle moyenne de flavan-3-ols est nettement inférieure aux quantités utilisées dans la plupart des études d'intervention nutritionnelles (Vogiatzoglou et al., 2013). Il existe plusieurs études qui mettent en évidence des effets bénéfiques des flavanols sur les performances de mémoire. Les effets moléculaires ont également été abordés *in vitro* et *in vivo*. Certaines études ont évalué les effets bénéfiques de flavanols en utilisant des extraits de pépins de raisin. En effet, les pépins de raisin sont riches en composés phénoliques monomères tels que la catéchine, l'épicatéchine, en proanthocyanidines sous forme de dimères, trimères et tétramères. Ainsi, ces études ont montré qu'une supplémentation avec un extrait de pépins de raisin améliorerait significativement les performances de mémoire de rats

âgés et ceci pouvait être relié à une réduction de la glycémie et à une diminution du stress oxydatif dans l'hippocampe (Balu et al., 2005; Asha Devi et al., 2011). En effet, l'effet promnésiant de l'extrait de pépins de raisin induit les mécanismes de défense antioxydants en atténuant la peroxydation lipidique et l'oxydation protéique. Une action positive sur le système cholinergique a également été décrite, qui va dans le même sens que l'action bénéfique de l'extrait de pépins de raisins sur la mémoire (Devi et al., 2006; Asha Devi et al., 2011). Une étude récente a également utilisé les flavanols purs afin d'évaluer, chez des rats mâles âgés de 18 mois, leur impact sur la mémoire et les mécanismes moléculaires sous-jacents. Les rats ont été supplémentés en flavanols purs (catéchine et épicatechine), à des doses similaires à celles trouvées dans le bleuets, pendant 6 semaines et des améliorations significatives de mémoire de travail spatiale en lien avec une augmentation de BDNF (brain-derived neurotrophic factor) dans l'hippocampe ont été observées (Rendeiro et al., 2013b). L'épicatechine, administrée pendant 6 semaine en combinaison avec une activité physique, améliorerait l'apprentissage et la mémoire spatiale de référence, ceci associé à une augmentation de la densité des épines dendritiques dans le GD de l'hippocampe, une hyper expression de gènes hippocampiques liés à l'apprentissage et une diminution de l'expression de gènes associés à l'inflammation et la mort cellulaire. Lorsqu'elle est administrée seule, sans stimulation de l'activité physique concomitante, l'épicatechine améliore la rétention de mémoire spatiale et augmente l'angiogenèse dans le GD. Les effets sur l'expression des gènes -hyper expression de gènes impliqués dans la mémoire et hypo-expression de gènes associés à la réponse inflammatoire- est également observée (van Praag et al., 2007). Plus précisément, le flavanol (-)-épicatechine et un de ses métabolites, le 3-O-méthyl(-)-épicatechine, exerceraient un effet stimulant sur ERK1/2 et sur la régulation du facteur de transcription CREB. De plus, ces flavanols pourraient protéger les neurones contre les dommages oxydatifs par un mécanisme impliquant la suppression de JNK (c-Jun N-terminal kinases) et de ses partenaires en aval, c-Jun et pro-caspase-3 (Spencer et al., 2001; Schroeter et al., 2007). Il a également été montré *in vitro*, sur une lignée de cellules gliales en culture, que la catéchine isolée du thé vert, protège les cellules d'un stress oxydatif induit, et réduit la mort cellulaire en réduisant l'activité de NF-kB et de p53 (Huang et al., 2005). De plus, des concentrations physiologiquement pertinentes d'épicatechine et de catéchine permettent d'inhiber la libération de TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ) par des cellules gliales primaires, ce qui suggère que les flavanols peuvent également avoir des effets anti-inflammatoires dans le cerveau (Vafeiadou et al., 2009).

#### ***IV.5.3. Anthocyanes: effets sur le déclin cognitif lié à l'âge***

La plupart des études réalisées dans le but d'évaluer les effets potentiels des anthocyanes sur la santé ont été réalisées à partir d'extraits de fruits riches en anthocyanes, mais certaines d'entre elles ont été effectuées en utilisant des métabolites d'anthocyanes. Les anthocyanes font partie des principaux composants de l'alimentation en particulier pour ceux qui consomment régulièrement des baies ou des produits dérivés tel les jus ou le vin rouge (Phenol-Explorer). Contrairement à d'autres flavonoïdes qui sont absorbés et excrétés, les anthocyanes ne semblent pas subir un métabolisme extensif en glucuronides et dérivés sulfates. Dans des études alimentaires chez l'Homme, les taux classiques d'anthocyanes dans les urines sont <0,1% de l'apport (Del Rio et al., 2010). Par exemple, Wu et al. ont rapporté une récupération urinaire d'anthocyanes de bleuet de 0,004% chez des femmes âgées (Wu et al., 2002). Ces faibles taux de récupération peuvent être la conséquence des réarrangements structuraux des anthocyanes en réponse au pH. De tels changements sont susceptibles de se produire *in vivo* lorsque les anthocyanes passent d'un faible pH dans l'estomac à des conditions plus basiques dans l'intestin grêle.

Dans des études sur les rongeurs, la consommation d'aliments enrichis en anthocyanes prévient les troubles de mémoire (Cho et al., 2003; Ramirez et al., 2005; Barros et al., 2006; Shukitt-Hale et al., 2006). Ainsi, 3 mois d'un régime enrichi avec du bleuet, peuvent améliorer les performances dans des tâches de mémoire de travail spatiale chez le rat âgé (Williams et al., 2008). Pour expliquer ces effets cette étude a montré que cette supplémentation induit une augmentation de l'expression de CREB, permet d'augmenter les niveaux de BDNF et pro-BDNF dans l'hippocampe et d'augmenter l'expression de ERK1/2, CaMKII (Calmodulin-dependent kinase II), CaMKIV (Calmodulin-dependent kinase IV), PKA (protéine kinase A), Akt (protéine kinase B), mTOR (Mammalian target of rapamycin) et les niveaux de Arc/Arg3 (Activity-regulated cytoskeleton-associated protein) dans l'hippocampe. Des effets similaires ont également été montrés en utilisant des anthocyanes pures. Ainsi, une supplémentation avec des anthocyanes pures pendant 6 semaines chez des rats âgés de 18 mois induisait des améliorations significatives de la mémoire spatiale en lien avec une augmentation de BDNF dans l'hippocampe (Rendeiro et al., 2013b). Dans un modèle murin de vieillissement accéléré induit par le D-galactose (D-gal), Shan et al. ont rapporté que 4 semaines de gavage avec un extrait de patate douce de couleur pourpre (PSPC) pouvaient atténuer les troubles de mémoire induit par D-gal en partie *via* une amélioration du statut antioxydant et anti-inflammatoire (Shan et al., 2009). Dans un autre modèle de vieillissement

accéléralé (souris SAMP8), 12 semaines de supplémentation avec un extrait de mûre (mulberry) riche en anthocyanes amélioreraient les capacités d'apprentissage et de mémoire et avaient également un effet hépatoprotecteur *via* la régulation des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) (JNK, p38, ERK) et l'activation de Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) (Shih et al., 2010). En lien avec cette précédente étude, et en utilisant le même modèle, il a récemment été montré, qu'une supplémentation en cyaniding-3-O-galactoside de bleuet pendant 8 semaines améliorerait l'apprentissage et la mémoire. Cette réversion des déficits cognitifs et comportementaux liés au vieillissement pourrait être expliquée par une amélioration du statut oxydatif *via* une activation de la superoxyde dismutase et une réduction de la teneur en malondialdéhyde dans les tissus du cerveau et le plasma. En outre, une augmentation de la phosphorylation de ERK dans l'hippocampe, une diminution des altérations de la couche de cellules pyramidales et plus globalement une amélioration de la survie des neurones de l'hippocampe ont également été observé (Tan et al., 2014). Il est intéressant de souligner que ces effets bénéfiques des anthocyanines sur les fonctions cognitives ont également été mis en évidence chez des animaux plus jeunes. Une amélioration de l'apprentissage et de la mémoire, et également un effet anxiolytique des anthocyanines ont été observés chez des souris et des rats adultes (souris : 3-4 mois ; rats : 10 semaines et 12 mois). Au niveau moléculaire, ces études ont montré une réduction des dommages oxydatifs de l'ADN dans le tissu cérébral, une diminution de la peroxydation lipidique, une teneur en acide ascorbique et glutathion plus élevée au niveau cérébral, et une diminution d'acétylcholinestérase (AChE) métabolisant l'acétylcholine, essentielle pour la régulation des fonctions cognitives, en choline. De plus, il a été rapporté une modulation de l'activation de ERK1/2 et une augmentation de CREB, BDNF et pro BDNF dans l'hippocampe (Ramirez et al., 2005; Barros et al., 2006; Papandreou et al., 2009; Rendeiro et al.). Plus récemment, Rendeiro et al. ont montré qu'une supplémentation de 3 semaines avec du bleuet chez des rats mâles âgés de 8 semaines facilite l'acquisition et la consolidation de la mémoire spatiale et l'augmentation des niveaux de PSA-NCAM (polysialylated form of the neural cell adhesion molecule) dans le GD de l'hippocampe accompagnée par une augmentation des récepteurs NMDA NR2B dans l'hippocampe (Rendeiro et al., 2013a). Cette supplémentation module également la signalisation ERK/CREB/BDNF hippocampique et active la voie Akt/mTOR/Arc. Il est également suggéré que les polyphénols pourraient agir sur les processus inflammatoires, mais il y a très peu de données concernant l'influence des anthocyanes sur la neuro-inflammation. L'exposition *in vitro* de cellules microgliales à un extrait de bleuet riche en anthocyanes induit une suppression significative de l'expression des



gènes iNOS (Inducible nitric oxide synthase) et COX-2 (Cyclo-oxygénase 2) (Lau et al., 2007). Toutefois, lorsque les cellules gliales sont exposées à des anthocyanes pures, la cyanidine ou la pélargonidine, aucun effet n'est observé sur l'expression de iNOS ou la libération de TNF- $\alpha$  (Vafeiadou et al., 2009).

#### ***IV.5.4. Le Resvératrol: effets sur le déclin cognitif lié à l'âge***

Le resvératrol est un polyphénol que l'on trouve principalement dans le raisin et le vin rouge et qui a des activités biologiques diverses conférant une protection contre le stress oxydatif, l'inflammation, les maladies cardiovasculaires et le cancer (Kris-Etherton et al., 2002; King et al., 2005; Baur and Sinclair, 2006; Athar et al., 2007 ; Shankar et al., 2007). Comme indiqué précédemment, le resvératrol a également des effets bénéfiques sur le déclin cognitif lié à l'âge. En effet, le resvératrol peut atténuer ces déficits en améliorant par exemple la mémoire de travail, l'apprentissage et la mémoire spatiale ou l'activité locomotrice spontanée dans différents modèles animaux tels que des souris âgées présentant des déficits induits par du LPS ou encore le microcèbe murin (Abraham and Johnson, 2009; Dal-Pan et al., 2011a ; Harada et al., 2011). Récemment, il a été observé une amélioration significative de l'angiogenèse et de la neurogenèse dans le GD de l'hippocampe chez ces souris (Harada et al., 2011). L'une des principales hypothèses expliquant comment le resvératrol pourrait produire des effets bénéfiques sur la santé implique la modulation de SIRT1 (sirtuine 1), une des sept protéines de la famille des sirtuines. De nombreuses études ont évalué ce processus visant à déterminer si l'interaction entre le resvératrol et SIRT1 était directe ou indirecte mais ce point reste encore en suspend. Plusieurs points soutiennent l'hypothèse selon laquelle SIRT1 est activée par le resvératrol, et que cela pourrait expliquer une partie de ses effets bénéfiques observés *in vivo* (Howitz et al., 2003; Picard et al., 2004; Baur and Sinclair, 2006; Lagouge et al., 2006; Zang et al., 2006 ; Bordone et al., 2007; Banks et al., 2008; Feige et al., 2008; Pfluger et al., 2008; Csiszar et al., 2009; Dai et al., 2010; Gracia-Sancho et al., 2010; Pacholec et al. ). Le resvératrol inhibe aussi indirectement la voie PI3K / mTOR / S6K (Haider et al., 2002; Cao et al., 2004; Frojdo et al.; Chan et al.; Brito et al., 2009). SIRT1 et mTOR pourraient être des membres d'un même réseau sirtuines/mTOR (Medvedik et al., 2007), et il est probable que mTOR (voie pro-vieillessement) et les sirtuines (voie anti-vieillessement) s'antagonise l'un l'autre (Blagosklonny, 2007). Han et al. ont enquêté sur l'existence éventuelle de sites de liaison spécifiques des polyphénols au niveau de la membrane plasmique cellulaire dans le cerveau de rat (Han et al., 2006). Leurs résultats suggèrent que l'action neuroprotectrice de divers polyphénols et d'analogues du resvératrol pourrait se faire

par l'activation d'un site commun de liaison à un "récepteur" particulièrement enrichi au niveau de la membrane plasmique cellulaire dans le cerveau de rat.

Par ailleurs, le resvératrol pourrait agir sur les voies de la cyclooxygénase et de la 5-lipoxygénase, essentielles dans la production de molécules pro-inflammatoires (Simmons et al., 2004). Des inhibiteurs de ces enzymes sont utilisés en tant que médicaments à des fins anti-inflammatoires. Parce que le resvératrol est un inhibiteur efficace de l'activité de la cyclooxygénase *in vivo* (Afaq et al., 2003; Khanduja et al., 2004; Aziz et al., 2005), ses propriétés anti-inflammatoires ont été étudiées. Le resvératrol administré par voie intraveineuse diminue l'inflammation induite par l'ischémie/reperfusion (Shigematsu et al., 2003). Les effets anti-inflammatoires du resvératrol chez la souris âgée pourraient être également liés à sa capacité à inhiber des facteurs impliqués dans la transcription de gènes comme les MAPK, AP-1 et NF-kB (Holmes-McNary and Baldwin, 2000; Manna et al., 2000; Howitz et al., 2003; Yeung et al., 2004; Chen et al., 2005). Le lien entre les voies de signalisation de SIRT1 et de NF-kB est particulièrement intéressant parce que, selon un certain nombre d'auteurs, SIRT1 prolongerait la durée de vie en diminuant l'activité de la voie de signalisation de NF-kB et cela serait suffisant pour annuler les modifications d'expression des gènes associées à l'âge chez la souris (Yeung et al., 2004 ; Adler et al., 2007; Adler et al., 2008). De plus, une diminution du niveau des marqueurs de l'inflammation comme l'IL-1b a été observé à la fois dans l'hippocampe et le plasma des souris supplémentées en resvératrol. L'étude *in vitro* de son impact dans des cellules microgliales a confirmé que le resvératrol inhibait fortement la production d'IL-1b induite par le LPS (Abraham and Johnson, 2009). Ainsi, le resvératrol pourrait présenter une alternative intéressante aux traitements actuels de l'inflammation chronique. Le resvératrol présente aussi un effet antioxydant important, cependant, la nature de cet effet, s'il est direct ou s'il résulte de l'activation de voies qui elles-mêmes activent les défenses anti-oxydantes naturelles des cellules, n'est pas encore déterminé. Plusieurs études ont montré que le resvératrol était capable d'inhiber la production de ROS (reactive oxygen species) par les neutrophiles, les monocytes et les macrophages (Rotondo et al., 1998; Jang et al., 1999; Surh et al.; Martinez and Moreno, 2000; Moreno, 2000). Chez un modèle d'hypertension chez le rat, prédisposé à des attaques, le resvératrol réduit significativement les marqueurs du stress oxydatif dans le sérum et l'urine (Mizutani et al., 2001). De plus, chez le cobaye, il permet de diminuer la concentration de ROS générés par la menadione (Floreani et al., 2003). Ces résultats indiquent que le resvératrol peut supprimer les augmentations physiopathologiques ou

induites de la peroxydation des lipides et de l'oxydation d'autres macromolécules *in vivo*, mais le caractère direct ou indirect de son mécanisme d'action n'est toujours pas déterminé. D'autres données sont en faveur de ces effets protecteurs, en effet le resvératrol peut considérablement augmenter l'expression mitochondriale de MnSOD (manganese superoxide dismutase) dans les cellules MRC-5, ainsi que dans les tissus cérébraux de souris (Robb et al., 2008). Malgré tous ces arguments, il est important de souligner que même si, dans la littérature scientifique, le resvératrol est largement reconnu comme étant responsable des effets protecteurs du vin rouge (Sakata et al., 2010; Chu et al., 2011), il est aujourd'hui admis qu'il n'est certainement pas seul en cause. En effet, la quantité de stilbènes dans le vin rouge est si faible que plus de 60 litres devraient être consommés quotidiennement par l'Homme pour atteindre les quantités qui se sont révélées efficaces pour induire une augmentation de la longévité et avoir des effets protecteurs dans les études chez l'animal (Corder et al., 2003). Le resvératrol est un composant très mineur dans l'alimentation humaine, son utilisation en tant que tel ne pourrait se faire que comme agent thérapeutique à des doses pharmacologiques.





## **OBJECTIFS**



Le vieillissement est associé à l'apparition de déficits cognitifs mais également à une augmentation du risque de développer des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Il est aujourd'hui bien admis que l'intégrité de l'hippocampe est essentielle pour les processus de mémoires et il a été montré à de nombreuses reprises que cette structure cérébrale est particulièrement affectée lors du vieillissement. On sait en effet que la mémoire dépendante de l'hippocampe (O'Keefe et al., 1975; Morris et al., 1982; Moser et al., 1995; Vargha-Khadem et al., 1997; Teng and Squire, 1999; de Hoz et al., 2005), est fortement affectée par l'âge chez différentes espèces telles que les rongeurs (Barnes, 1979; Markowska et al., 1989; Gallagher and Rapp, 1997; Bach et al., 1999), les chiens (Milgram, 2003; Boutet et al., 2005; Christie et al., 2005), les singes (Lai et al., 1995; Gallagher and Rapp, 1997; Rapp et al., 1997) et également l'Homme (Uttl and Graf, 1993; Gallagher and Rapp, 1997; Wilkniss et al., 1997; Gazova et al., 2013). Le lien entre les altérations neurobiologiques de l'hippocampe et la genèse des déficits de mémoire observés au cours du vieillissement est également admis (Erickson and Barnes, 2003). En effet, ces altérations hippocampiques liées à l'âge concernent plusieurs niveaux d'intégration : depuis des modifications moléculaires qui induisent au niveau cellulaire des perturbations dans les voies de signalisations, jusqu'au niveau tissulaire, des altérations de la plasticité cérébrales qui se traduisent au niveau comportemental par des déficits d'apprentissage et de mémoire.

Ainsi, à l'heure où la population âgée est en constante augmentation et où la problématique socio-économique de la dépendance liée à l'âge devient un problème majeur dans les sociétés à fort développement, la définition de stratégies de prévention des déficits de mémoires ou de ralentissement du déclin cognitif devient un objectif de recherche très important. La nutrition, qui concerne l'individu tout au long de sa vie, fait aujourd'hui partie des voies de recherche prometteuses dans ce domaine. Parmi les aliments fonctionnels ciblant la mémoire, les fruits et légumes, riches en polyphénols pourraient participer au maintien des processus neurobiologiques qui sous-tendent les performances de mémoire et avoir en cela une action préventive vis-à-vis du vieillissement cognitif (Joseph et al., 2005; Gomez-Pinilla, 2008; Queen and Tollefsbol, 2010; Murphy et al., 2014). Les polyphénols, présents dans notre alimentation, et en particulier les flavonoïdes et le resvératrol pourraient en effet améliorer l'apprentissage et la mémoire chez l'animal mais également chez l'Homme (Letenneur, 2004; Dinges, 2006; Haque et al., 2006; Letenneur et al., 2007; Kaur et al., 2008; Williams et al., 2008; Krikorian et al., 2010a; Krikorian et al., 2010b; Krikorian et al., 2012; Witte et al., 2014). Leurs mécanismes d'action sont encore peu compris mais on sait qu'ils peuvent



moduler favorablement les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans l'apprentissage et la mémoire (Spencer, 2008).

Dans le cadre du projet Neurophénols, l'objectif de mon projet de thèse était de définir un mélange d'extraits de raisin et de bleuet, standardisé en polyphénols spécifiques ayant un effet bénéfique sur les fonctions cognitives chez l'animal et chez l'Homme et de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent ses effets sur la mémoire.

Ainsi, ce projet de thèse visait ainsi à répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les conséquences du vieillissement sur l'apprentissage et la mémoire spatiale chez la souris et comment l'extrait Neurophenol® peut-il moduler les déficits comportementaux mis en évidence ?
- Quels sont les mécanismes d'action cérébrale des polyphénols utilisés?

Nous avons ainsi étudié les effets d'une supplémentation nutritionnelle avec l'extrait Neurophenol® sur les processus mnésiques et sur la plasticité cérébrale chez la souris âgée.

Dans une première partie de ce travail nous avons étudié l'effet d'une supplémentation avec le mélange Neurophenol® sur la mémoire en utilisant plusieurs approches comportementales permettant d'évaluer leur impact sur la mémoire à long terme ainsi que sur la mémoire à court terme au cours du vieillissement. Nous avons également abordé les effets de ce mélange de polyphénols sur la neurogenèse hippocampique adulte et l'expression de gènes impliqués dans la plasticité neuronale.

Dans une deuxième partie, pour mieux comprendre les effets observés, nous nous sommes focalisés sur l'apprentissage spatial dépendant de l'hippocampe en étudiant les (i) les effets du vieillissement sur cet apprentissage et (ii) les effets de la supplémentation nutritionnelle. L'expression de gènes hippocampiques impliqués dans les processus neurobiologiques qui sous-tendent cet apprentissage a également été étudiée.

En parallèle, une étude clinique visant à évaluer l'efficacité d'une supplémentation avec le mélange Neurophenol® sur les performances mnésiques chez la personne âgée a été mise en place et est en cours de réalisation. Le design expérimental de cette étude fait l'objet de la troisième partie de ce manuscrit.

**PARTIE I. Effet d'une supplémentation en polyphénols sur l'apprentissage et la mémoire et la neurogenèse adulte hippocampique au cours du vieillissement.**

Dans cette première partie nous avons exploré la mémoire dépendante de l'hippocampe en utilisant deux tests comportementaux afin d'évaluer les effets de l'extrait Neurophenol® sur le déclin mnésique lié au vieillissement. Nous avons montré que la supplémentation en polyphénols permettait de rétablir les capacités d'apprentissage spatial dans le labyrinthe aquatique et la mémoire de reconnaissance d'objet altérées chez la souris âgée. De plus, nous avons montré que l'extrait Neurophenol® permettait d'augmenter la proportion de neurones immatures avec prolongements dans l'hippocampe chez les souris âgées supplémentées. Nous avons également mis en évidence que l'extrait Neurophenol® peut moduler l'expression de neurotrophine au niveau hippocampique chez les animaux supplémentés adultes et âgés.

Les résultats de cette première partie font l'objet d'une publication en préparation.

*Publication 1: A mix of grape and blueberry polyphenol-extracts improve learning, memory and hippocampal neurogenesis in aged mice*

**PARTIE II. Effet d'une supplémentation en polyphénols sur l'apprentissage spatial au cours du vieillissement.**

Les résultats de cette deuxième partie montrent que le vieillissement altère les capacités d'apprentissage et que l'extrait Neurophenol® peut améliorer ces capacités chez la souris âgée. Une analyse détaillée des stratégies comportementales mises en jeu par les souris lors de l'apprentissage a été réalisée montrant pour la première fois l'évolution des stratégies de recherche de la plateforme chez les souris jeunes et âgées contrôles d'une part, puis supplémentées en polyphénols. Les résultats obtenus en biologie moléculaire montrent que le vieillissement et l'extrait Neurophenol® peuvent moduler l'expression hippocampique de gènes impliqués dans la plasticité neuronale et la mémoire.

Ces résultats font l'objet d'une publication soumise dans *Frontiers in Behavioral Neuroscience*.

*Publication 2: A polyphenol supplementation can prevent age-induced alterations in the adoption of spatial strategies*

**PARTIE III. Effet d'une supplémentation en polyphénols sur le fonctionnement cérébral et la mémoire au cours du vieillissement : approche clinique.**

Dans cette partie nous présentons le design expérimental de l'étude clinique du projet Neurophenols. Cette étude est une étude bicentrique menée en France et au Québec visant à évaluer les capacités mnésiques de sujets âgés avant et après 6 mois de supplémentation avec l'extrait Neurophenol® administré sous forme de gélules. Différents paramètres moléculaires seront également mesurés au terme de l'étude.

Ce protocole est publié sur ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02063646.

*Clinical Trial: Effect of a Polyphenol-rich Food Supplement on Cognitive Function in Healthy Aging Adults (Neurophenol)*





## **OBJECTIVES**



Aging is associated with the development of cognitive deficits but also with an increased risk of dementia such as Alzheimer's disease. It is now well accepted that the integrity of the hippocampus is essential for memory processes and it has been shown in several studies that this brain structure is particularly affected during aging. It is known that hippocampal dependent memory (O'Keefe et al., 1975; Morris et al., 1982; Moser et al., 1995; Vargha-Khadem et al., 1997; Teng and Squire, 1999; de Hoz et al., 2005) is strongly affected by age in different species, such as rodents (Barnes, 1979; Markowska et al., 1989; Gallagher and Rapp, 1997; Bach et al., 1999), dogs (Milgram, 2003; Boutet et al., 2005; Christie et al., 2005), monkeys (Lai et al., 1995; Gallagher and Rapp, 1997; Rapp et al., 1997) and also humans (Uttl and Graf, 1993; Gallagher and Rapp, 1997; Wilkniss et al., 1997; Gazova et al., 2013). The link between the neurobiological alterations in the hippocampus and the genesis of memory deficits observed during aging is also accepted (Erickson and Barnes, 2003). Indeed, these hippocampal changes associated with aging involve several levels of integration: from molecular changes that cause disturbances in signaling pathways at the cellular level, to the tissue level, and alterations in brain plasticity that result in deficits in learning and memory at the behavioral level.

Thus, while the elderly population is steadily increasing and socio-economic problems of the age-related addiction become a major problem in societies with strong development, to determine strategies for prevention of memory deficits or to slow down cognitive decline is a main research objective. Nutrition, that is important for all individuals throughout their life, is now part of promising research ways in this field. Among the functional foods targeting memory, fruits and vegetables, rich in polyphenols could contribute to the maintenance of neurobiological processes underlying memory performances and have a preventive action on cognitive aging (Joseph et al., 2005; Gomez-Pinilla, 2008; Queen and Tollefsbol, 2010; Murphy et al., 2014). Polyphenols, present in our diet, particularly flavonoids and resveratrol may indeed improve learning and memory in animals but also in humans (Letenneur, 2004; Dinges, 2006; Haque et al., 2006; Letenneur et al., 2007; Kaur et al., 2008; Williams et al., 2008; Krikorian et al., 2010a; Krikorian et al., 2010b; Krikorian et al., 2012; Witte et al., 2014). Their mechanisms of action are yet poorly understood but we know they can favorably modulate the cellular and molecular processes involved in learning and memory (Spencer, 2008).

Under the Neurophenols project, the aim of my thesis project was to define a mix of extracts from grape and blueberry, standardized in specific polyphenols, having a beneficial



effect on cognitive functions in animals and humans and to better understand the molecular and cellular mechanisms underlying their effects on memory.

Thus, this thesis project aimed at answering the following questions:

- What are the consequences of aging on learning and spatial memory in mice and how can the Neurophenol<sup>TM</sup> extract modulate behavioral deficits highlighted?
- What are the mechanisms of action of the polyphenols?

Thus, we have studied the effects of a nutritional supplementation with the Neurophenol<sup>TM</sup> extract on memory processes and brain plasticity in older mice.

In the first part of this work we have studied the effect of a supplementation with the Neurophenol<sup>TM</sup> mix on memory using several behavioral approaches to assess their impact on long-term memory as well as the short-term memory during aging. We have also studied the effects of the polyphenols mix on adult hippocampal neurogenesis and the gene expression of proteins involved in neuronal plasticity.

In the second part, to better understand the observed effects, we have focused on spatial learning dependent of the hippocampus by studying (i) the effects of aging on learning and (ii) the effects of a nutritional supplementation. The expression of hippocampal genes involved in the neurobiological processes underlying this learning has also been assessed.

In parallel, a clinical study to evaluate the efficacy of a supplementation with the Neurophenol<sup>TM</sup> mix on memory performance in the elderly has been set up and is still under progress. The experimental design of this study is the subject of the third part of this manuscript.

### **PART I. Effect of a polyphenol supplementation on learning and memory and on adult hippocampal neurogenesis during aging.**

In this first part we have explored the hippocampal-dependent memory using two behavioral tests to evaluate the effects of the Neurophenol<sup>TM</sup> extract on age-related memory decline. We have shown that supplementation with polyphenols could restore spatial learning abilities in the water maze and recognition memory altered in aged mice. In addition, we have shown that the Neurophenol<sup>TM</sup> extract could increase the proportion of newly generated

neurons with prolongations in the hippocampus in aged supplemented mice. We have also demonstrated that the Neurophenol<sup>TM</sup> extract could modulate the expression of the hippocampal neurotrophin NGF in both adults and aged supplemented animals.

The results of this first part are the subject of a publication in preparation.

*Publication 1: A mix of grape and blueberry polyphenol-extracts improve learning, memory and hippocampal neurogenesis in aged mice*

### **PART II. Effect of a polyphenol supplementation on spatial learning during aging.**

The results of this second part show that aging impairs learning abilities and that the Neurophenol<sup>TM</sup> extract can improve them in older mice. A detailed analysis of behavioral strategies used by mice during learning hasn been performed. For the first time we have shown the evolution of the search strategies to find the platform in young and old control mice, and in mice supplemented with polyphenols. The biomolecular results have revealed that aging and the Neurophenol<sup>TM</sup> extract can modulate hippocampal gene expression of proteins involved in neuronal plasticity and memory.

These results are the subject of a publication submitted in Frontiers in Behavioral Neuroscience.

*Publication 2: A polyphenol supplementation can prevent age-induced alterations in the adoption of spatial strategies*

### **PART III. Effect of a polyphenol supplementation on brain functions and memory during aging: a clinical approach.**

In this section we present the experimental design of the Neurophenols project clinical study. This bicentric study is conducted in France and Quebec and aims to assess memory capacities of elderly patients before and after 6 months of supplementation with the Neurophenol<sup>TM</sup> extract administered as capsules. Different molecular parameters will also be measured at the end of the study.

This protocol is available on ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02063646.

*Clinical Trial: Effect of a Polyphenol-rich Food Supplement on Cognitive Function in Healthy Aging Adults (Neurophenol)*





## **MATERIELS ET METHODES**



## **I. Animaux, supplémentation et design expérimental**

### ***I.1. Animaux***

Les expériences ont été réalisées sur des souris mâles C57BL/6J provenant de l'élevage Janvier (France). Les animaux ont été placés dans des cages individuelles dans une animalerie maintenue sous des conditions de température (21-23°C) et d'hygrométrie (60%) constantes avec un cycle lumière/obscurité de 12h/12h (8h00-20h00). Les animaux ont eu un accès libre à la nourriture et à l'eau de boisson. L'état physique ainsi que la croissance pondérale des animaux ont été suivis tout le long du protocole expérimental. Les protocoles ont été menés conformément aux recommandations de l'Union Européenne (86/609/EEC) et de la France (87/848). Ils ont été approuvés par le comité d'éthique de Bordeaux (N°5012085-A).

### ***I.2. Supplémentation en polyphénols***

La supplémentation en polyphénols a été réalisée *via* la nourriture sur la base d'un régime équilibré (INRA, Jouy-en-Josas, France) avec ajout de 0,51% d'extrait Neurophenol® (Activ'Inside, France). L'extrait Neurophenol® est composé de flavonoïdes (monomères, oligomères, flavonols, anthocyanes et acides phénoliques) et de resvératrol provenant d'extrait de raisin *Vitis vinifera* (Activ'Inside, France) et d'extrait de bleuet sauvage *Vaccinium angustifolium* (NutraCanada, Canada). Les doses ont été établies sur la base de précédentes études publiées et restent confidentielles à ce jour. La méthode de supplémentation choisie permet un apport quotidien en polyphénols, quantifiable par un relevé de la nourriture consommée. La supplémentation *via* l'eau de boisson, testée dans un premier temps, s'est révélée inappropriée car les polyphénols sont très sensibles à l'oxydation et se dégradent rapidement dans un milieu aqueux. Le gavage n'était pas une méthode compatible avec la durée de la supplémentation prévue car les risques d'irritations et d'inflammation de l'œsophage ainsi que le stress généré par cette opération menée quotidiennement étaient trop importants et non compatible avec les méthodes comportementales à mettre en œuvre. Une supplémentation par « pellets » a également été testée mais la concentration en polyphénols, très importante dans ces pastilles à la dose choisie (200mg), donnait un fort goût amer et une forte astringence au produit, et en ayant un impact important sur l'appétence diminuait significativement la consommation.



### ***1.3. Séries expérimentales***

#### *1.3.1. Effets des polyphénols sur l'apprentissage, la mémoire et la neurogenèse au cours du vieillissement (série 1)*

Quatre groupes de souris ont été constitués à partir de deux lots de 40 souris. Les deux lots étaient constitués de 20 souris adultes de 6 semaines et de 20 souris âgées de 16 mois. Ces deux lots ont permis de répéter deux fois les expériences. Au total, 20 souris adultes et 20 souris âgées ont été nourries avec un régime contrôle (INRA, Jouy-en-Josas, France) et 20 souris adultes et 20 souris âgées ont reçu un régime enrichi en polyphénols (INRA, Jouy-en-Josas, France) contenant 0,51% d'extrait Neurophenol® (Activ'Inside). Pour cette étude nous avons testé une supplémentation de 14 semaines (12 semaines avant les tests comportementaux). L'effet de cette supplémentation en polyphénols et de l'âge a été évalué dans différents tests comportementaux (labyrinthe en croix surélevé, labyrinthe en Y, reconnaissance d'objets, labyrinthe aquatique de Morris). Les animaux ont ensuite été euthanasiés 1h30 après le probe test en labyrinthe aquatique et la moitié des cerveaux a été disséqué afin de réaliser des mesures d'expression de gènes par RT-qPCR et l'autre moitié a été post-fixée dans du paraformaldéhyde (PFA) afin d'analyser la neurogenèse hippocampique par immunohistochimie.

- Groupe adulte contrôle (n=20)
- Groupe adulte supplémenté en polyphénols (n=20)
- Groupe âgé contrôle (n=20)
- Groupe âgé supplémenté en polyphénols (n=20)

#### *1.3.2. Effets des polyphénols sur l'apprentissage spatial au cours du vieillissement (série 2)*

Pour cette étude 20 souris adultes de 6 semaines et 24 souris âgées de 16 mois ont été divisés aléatoirement en quatre groupes. Un groupe de souris adultes (n=10) et un groupe de souris âgées (n=12) ont reçu un régime contrôle exempt de polyphénols (INRA, Jouy-en-Josas, France) et les deux autres groupes de souris adultes (n=10) et âgées (n=12) ont reçu un régime enrichi en polyphénols (INRA, Jouy-en-Josas, France) contenant 0,51% d'extrait Neurophenol® (Activ'Inside). La composition du régime contrôle était la même que celle du régime enrichi en polyphénols, à l'exception du contenu en polyphénols. Le régime était donné aux souris dès leur arrivée au laboratoire (à l'âge de 6 semaines pour les souris adultes

et à 16 mois pour les âgées) et jusqu'à la fin de l'expérience (8 semaines / 6 semaines avant le début des tests comportementaux). L'effet de l'âge et de la supplémentation en polyphénols pendant 8 semaines a été évalué sur l'apprentissage spatial et la mémoire spatiale. Les différents groupes ont été soumis au test du labyrinthe aquatique de Morris. Afin de discriminer les qualités d'apprentissage spatial une analyse des stratégies de recherche de la plateforme a été réalisée pour chaque souris. Les animaux ont ensuite été euthanasiés 1h30 après le test de mémoire (probe test). Les structures cérébrales (hippocampe, striatum, cortex préfrontal) ont été prélevées afin de réaliser les analyses de biologie moléculaire (RT-qPCR) et de biochimie (western blot). Dans cette étude, nous ne présenterons que les résultats obtenus en biologie moléculaire à partir de l'hippocampe.

- Groupe adulte contrôle (n=10)
- Groupe adulte supplémenté en polyphénols (n=10)
- Groupe âgé contrôle (n=12)
- Groupe âgé supplémenté en polyphénols (n=12)

### *1.3.3. Effets des polyphénols sur l'espérance de vie*

L'espérance de vie a été observée sur 3 différents lots de souris (les deux précédents et un troisième lot afin d'augmenter les effectifs). Au total, 27 souris par groupe ont été observées. Les groupes étaient les mêmes que pour l'étude précédente : 27 souris adulte sous régime contrôle, 27 souris adulte sous régime enrichi en polyphénols, 27 souris âgées sous régime contrôle, 27 souris âgées sous régime enrichi en polyphénols. Le nombre de souris mortes au cours des expériences a été noté et une analyse de survie de Kaplan-Meier a été réalisée. Les groupes de souris adultes n'ayant pas subi de pertes nous sommes uniquement intéressés aux deux groupes de souris âgées.

- Groupe âgé contrôle (n=27)
- Groupe âgé supplémenté en polyphénols (n=27)

### *1.3.4. Biodisponibilité des polyphénols de l'extrait Neurophenol® chez la souris*

Afin d'évaluer si et quels polyphénols étaient retrouvés au niveau plasmatique et cérébral, des souris adultes (6 semaines) et âgées (16 mois) ont été nourries avec un régime contrôle ou un régime enrichi en polyphénols pendant 6 semaines avant d'être euthanasiées. Les cerveaux et le sang ont été prélevés au moment de l'euthanasie afin de quantifier les polyphénols présents dans le plasma et dans le cerveau de ces souris par UPLC-MS/MS.

- Groupe adulte contrôle (n=3)
- Groupe adulte supplémenté en polyphénols (n=10)
- Groupe âgé contrôle (n=3)
- Groupe âgé supplémenté en polyphénols (n=10)

## **II. Tests comportementaux**

Avant le début des tests comportementaux les animaux ont été manipulés pendant 2 jours à raison de 1min par souris.

### ***II.1. Labyrinthe aquatique de Morris***

L'épreuve du labyrinthe aquatique mise au point par Morris (Morris, 1984), permettait de mesurer les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale chez l'animal. Dans notre protocole expérimental, cette épreuve mettait plus particulièrement en jeu la mémoire spatiale de référence dépendante de la formation hippocampique. En effet, la tâche comportementale consistait pour l'animal à localiser un "but" spatial fixe, représenté ici par une plate-forme immergée dont la localisation reste constante, en utilisant des indices spatiaux distaux.

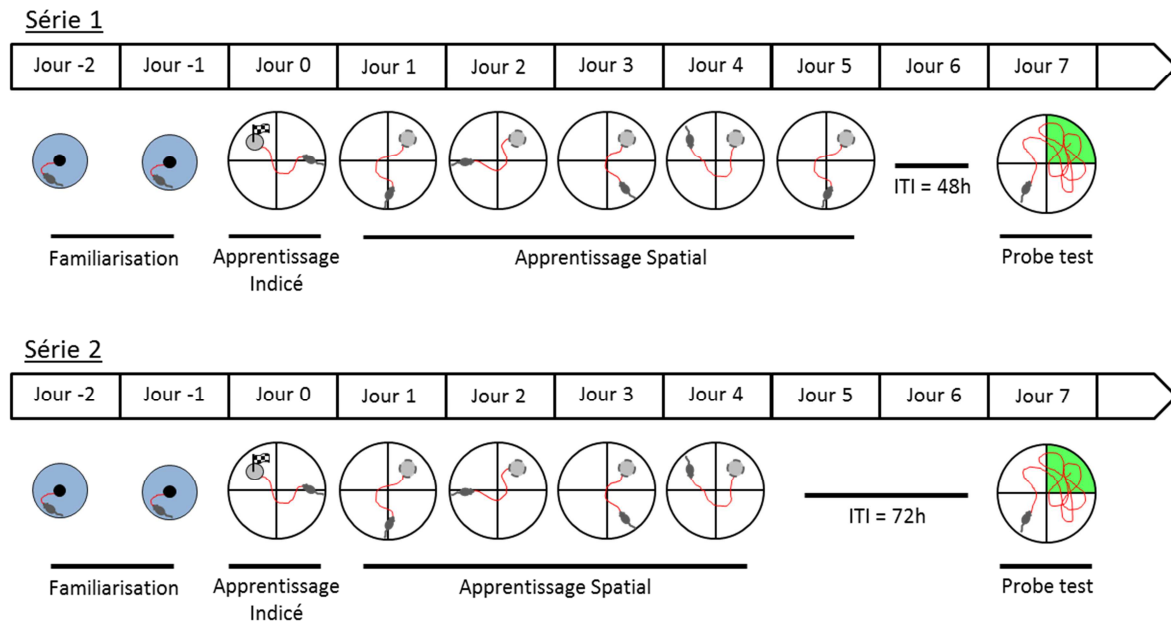
Le protocole choisi se déroule en 4 étapes (**Figure 8**):

**1-la familiarisation** : qui permet aux souris de se familiariser à la nage et au fait de monter sur une plateforme.

**2-l'apprentissage indicé** : permet d'évaluer la présence de déficits moteurs ou visuels et accentue la familiarisation. Les animaux doivent trouver une plateforme immergée indiquée par un indice.

**3-l'apprentissage spatial** de référence : les animaux doivent trouver une plateforme immergée et non visible en utilisant les indices visuels distaux.

**4-le probe test** : permet d'évaluer la mémoire spatiale. Les souris cherchent pendant 1min dans la piscine sans plateforme.



**Figure 8 : Procédure comportementale dans le labyrinthe aquatique de Morris.**

### *II.1.1. La familiarisation*

Le dispositif est constitué d'une baignoire de 65cm de diamètre et d'une plateforme de 8cm de diamètre. La baignoire est remplie d'eau à 22°C et la plateforme est émergée d'1mm hors de l'eau. La familiarisation se déroule dans la salle d'apprentissage, avec un éclairage néon et des rideaux blancs sont disposés autour de la pièce afin de dissimuler tout indice visuel. La plateforme est située au centre de la baignoire et est visible pour les animaux.

Le protocole se déroule sur 2 jours à raison de 3 essais consécutifs par jour. Au premier essai du premier jour la souris est placée 20sec sur la plateforme. L'animal est ensuite déposé au premier des trois points d'introduction déterminés au préalable. L'animal doit atteindre la plateforme pour terminer l'essai. Si la souris n'a pas atteint la plateforme après le cut-off fixé à 60sec, elle est guidée jusqu'à celle-ci puis laissée 20sec dessus. La souris réalise ainsi 3 essais le premier jour puis 3 essais le deuxième jour. On mesure ici la latence pour que la souris atteigne la plateforme.

### *II.1.2. L'apprentissage indicé*

Le jour suivant la familiarisation les animaux sont testés en apprentissage indicé. Cette phase permet d'évaluer la présence de déficits moteurs ou visuels. Les animaux doivent trouver une plateforme immergée indiquée par un indice.

Le dispositif est constitué d'une piscine circulaire de 1,50m de diamètre et de 50cm de profondeur. Elle est remplie d'une eau à 22°C rendue opaque par addition d'une peinture blanche non toxique. La piscine est divisée en quatre quadrants "virtuels" (Nord, Est, Sud, Ouest) à l'intérieur desquels une plate-forme (15cm de diamètre) peut être positionnée à mi-chemin entre le centre et la paroi de la piscine. L'appareil est situé dans une pièce éclairée par des néons et des rideaux blancs sont disposés autour de la pièce afin de dissimuler les indices visuels. La plateforme est placée au niveau du quadrant Nord et est immergée 1cm sous la surface de l'eau. Un indice visuel est fixé à la plateforme la rendant visible pour les animaux. Cette phase se déroule sur 1 jour et 6 essais non consécutifs (ITI≈5min). Au premier essai la souris est placée 30sec sur la plateforme. L'animal est ensuite déposé au premier des 4 points d'introduction déterminés au préalable. L'animal dispose de 90sec pour atteindre la plateforme. Si la souris n'a pas atteint la plateforme après le cut-off de 90sec elle est guidée jusqu'à celle-ci puis laissée 30sec dessus avant de retourner dans sa cage. On mesure la latence pour atteindre la plateforme, la distance et le chemin parcouru par les animaux (tracking). Ces paramètres ont été mesurés et enregistrés par un système de vidéo-tracking (Imetronic, France).

### *II.1.3. L'apprentissage spatial de référence*

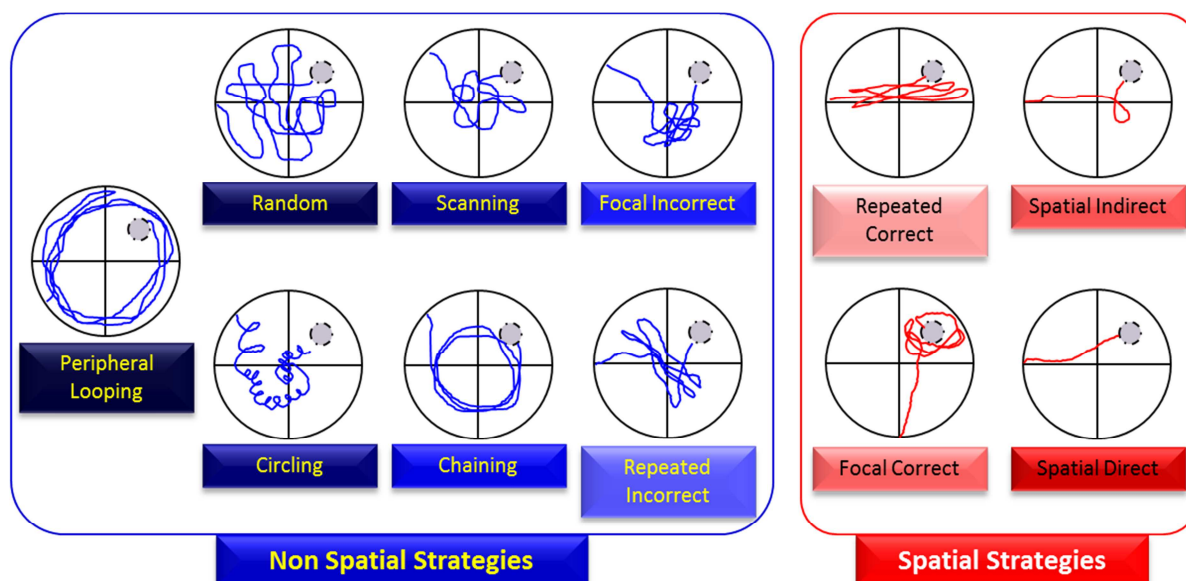
Après l'apprentissage indicé les animaux commencent la phase d'apprentissage spatial. Les animaux doivent apprendre à retrouver une plateforme immergée non visible en utilisant des indices visuels spatiaux.

Le dispositif est quasiment le même que le précédent. Pour cette phase il n'y a pas de rideaux autour de la pièce et de nombreux indices visuels sont disposés autour et leur localisation reste inchangée durant toute la durée du test. La plateforme est placée au niveau du quadrant Ouest et est immergée 1cm sous la surface de l'eau la rendant non visible pour les animaux. Cette phase se déroule sur 4 à 5 jours (les deux durées ont été testées) et 6 essais/jour non consécutifs (ITI≈5min). Lors de la deuxième expérience, au premier essai du premier jour la souris a été placée 30sec sur la plateforme. L'animal est ensuite déposé au premier des 4 points d'introduction déterminés au préalable. L'animal dispose de 90sec pour atteindre la plateforme. Si la souris n'a pas atteint la plateforme après le cut-off de 90sec elle est guidée jusqu'à celle-ci puis laissée 30sec dessus avant de retourner dans sa cage. On mesure la latence pour atteindre la plateforme, la distance et le chemin parcouru par les

animaux (tracking). Ces paramètres ont été mesurés et enregistrés par un système de vidéo-tracking (Imetronic, France).

#### *II.1.4. Analyse des stratégies d'apprentissage*

Les trajectoires de nage ont été enregistrées pour chaque essai au cours de l'apprentissage avec le logiciel de video-tracking Imetronic (France). Les stratégies de recherche de la plateforme ont été classifiées par deux expérimentateurs (à l'aveugle) puis assignées pour chaque essai en utilisant un patron de classification similaire à ceux précédemment développés pour d'autres études (Brody and Holtzman, 2006; Garthe et al., 2009; Ruediger et al., 2012). Suite à cette classification, ces stratégies ont été divisées arbitrairement en deux catégories : stratégie spatiale ou non-spatiale (**Figure 9**). Les stratégies spatiales comportent les stratégies « correcte répétée » ou « repeated correct » (lorsque l'animal nage dans la direction de la plateforme puis répète la même trajectoire à plusieurs reprises), « spatiale indirecte » ou « spatial indirect » (l'animal nage indirectement vers la plateforme en effectuant éventuellement une ou deux boucles), « spatiale directe » ou « spatial direct » (la souris nage directement vers la plateforme), et la « focale correcte » ou « focal correct » (l'animal nage puis cherche de façon intensive dans le quadrant où est située la plateforme). Les stratégies non-spatiales se composent d'abord des stratégies de « recherche globale » ou « global search » : la « recherche périphérique » ou « peripheral looping » (l'animal nage préférentiellement dans une zone de 15cm autour des bords de la piscine, comprenant la thigmotaxie), « au hasard » ou « random » (recherche dans toute la piscine en couvrant >75% de la surface), « en cercle » ou « circling » (la souris fait de tout petits cercles et peut faire quelques mouvements nets dans certaines directions), puis ensuite on retrouve des stratégies de « recherche locale » ou « local search » : le « balayage » ou « scanning » (l'animal cherche dans une zone limitée, souvent au centre, de la piscine en couvrant en 15 et 75% de la surface), la « boucle » ou « chaining » (la souris nage de façon circulaire à une distance assez fixe des bords supérieure à 15cm), la « incorrecte répétée » ou « repeated incorrect » (l'animal nage dans une direction précise qui ne correspond pas à la position de la plateforme et répète la même trajectoire à plusieurs reprises), et enfin la « focale incorrecte » ou « focal incorrect » (l'animal cherche de façon intensive dans une petite portion de la piscine qui ne contient pas la plateforme).



**Figure 9 : Classification des stratégies de recherche de la plateforme.**

### *II.1.5. Le probe test*

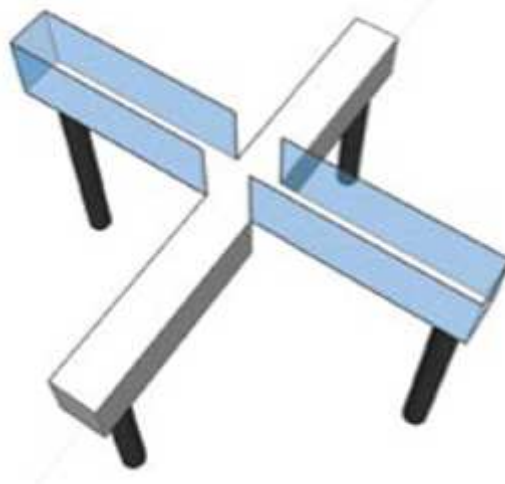
Le probe test permet d'évaluer la mémoire spatiale. Le probe test peut être effectué à différents temps. Pour nos expériences nous avons testés nos souris 48h et 72h (respectivement pour la première série expérimentale et pour la deuxième) après le dernier jour d'apprentissage. Pour cette phase la plateforme est retirée de la piscine. Le test se fait en un seul essai d'une durée de 60sec. L'animal est placé à un point d'introduction différent de ceux choisis pour l'apprentissage et cherche pendant 1min dans la piscine. La mémoire spatiale est évaluée en mesurant le temps passé dans le quadrant « cible », c'est-à-dire le quadrant où était localisée la plateforme lors de la phase d'apprentissage spatial. Le vidéo-tracking a été réalisé avec le logiciel SMART (Bioseb, France).

### *II.2. Labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus-maze)*

Le comportement de type anxieux des animaux a été évalué dans le test du labyrinthe en croix surélevé (**Figure 10**). Le labyrinthe est constitué de 4 bras de 40 cm de longueur et 10 cm de large séparés par un angle de 90°. Deux bras opposés sont sans parois (ouverts) et les deux autres ont des parois de 10cm de haut (fermés). Au centre se situe une plateforme ouverte sur les quatre bras (10cm x 10cm). Le dispositif est fabriqué en pvc gris avec un fond blanc. La hauteur du dispositif est de 80 cm. La luminosité dans chaque bras opposé est identique : environ 30 lux pour les bras fermés et environ 100 lux pour les bras ouverts.

Les souris sont placées sur la plateforme centrale au début du test et sont libres d'explorer le labyrinthe pendant 5min. Le temps passé dans les différentes zones a été mesuré par le système de vidéo-tracking SMART (Bioseb, France).

Ce dispositif permet de déterminer l'état d'anxiété des animaux qui vont spontanément éviter les bras ouverts naturellement anxiogènes et préférer les bras fermés. En effet, il a été montré que des traitements pharmacologiques par des anxiolytiques étaient efficaces pour contrecarrer l'aversion naturelle procurée par les bras ouverts.



**Figure 10 : Schéma du labyrinthe en croix surélevé.**

### ***II.3. Labyrinthe en Y***

Le principe du test est basé sur la curiosité des rongeurs pour l'exploration et sur leur capacité à discerner un environnement qu'ils ont déjà exploré (familier), d'un environnement qu'ils n'ont encore jamais découvert (nouveau). Il s'agit dans ce test de forcer les animaux à explorer un environnement restreint (2 bras sur 3 possibles) dans un labyrinthe en forme Y, puis, après un certain délai, de les replacer dans ce même environnement avec cette fois-ci la possibilité d'explorer la totalité du dispositif (3 bras sur 3 possibles). Il a été montré que lorsque le délai entre les 2 expositions est suffisamment important, la capacité de l'animal à dissocier le bras familier du bras nouveau s'apparente à de la mémoire spatiale (Conrad et al., 1996).

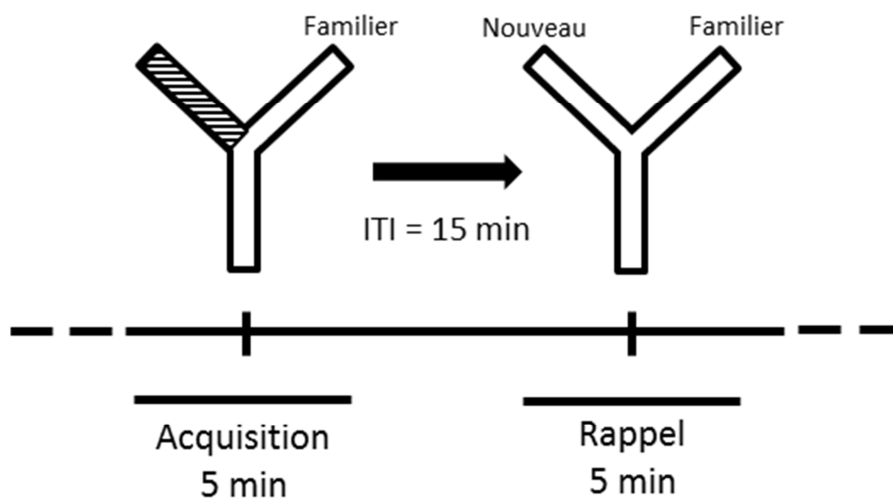


Le labyrinthe est constitué de 3 bras de 35 cm de longueur séparés par un angle de 120° et aux parois de 10cm de haut. Le dispositif est fabriqué en pvc gris. Des indices spatiaux distaux ont été implémentés dans la pièce autour de l'appareil et de la sciure saturée en odeur de souris (litière provenant de différentes cages des souris testées) a été placée sur le sol afin de favoriser l'exploration et de réduire les aspects anxiogènes inhérents au test comportemental. Chaque bras peut être fermé à l'aide d'une porte en pvc. La luminosité dans chaque bras doit être identique (30 lux).

Le test s'effectue en deux phases : une phase d'acquisition et une phase de rappel (**Figure 11**).

*Phase d'acquisition.* Durant cette phase, l'un des trois bras est fermé à l'aide d'une porte amovible (soit le bras droit, soit le bras gauche). La position du bras ouvert et du bras fermé est définie pseudo-aléatoirement de façon à ce qu'autant d'animaux soient présentés à chacune des configurations. L'animal est placé dans le bras de départ, libre d'explorer les 2 bras du labyrinthe pendant 5 min. L'animal explore ainsi le bras de départ et le bras dit ouvert. A la fin du test, la souris est ensuite replacée dans sa cage d'hébergement.

*Phase de rappel.* Cette phase permet de tester la mémoire des animaux. L'intervalle entre la première et la deuxième phase a été fixé à 15min afin d'évaluer la mémoire à court terme. La porte fermant l'un des bras est retirée et l'animal est à nouveau introduit dans le labyrinthe au niveau du même bras de départ que lors de la phase d'acquisition. La souris est libre d'explorer les 3 bras pendant 5min.



**Figure 11 : Procédure comportementale dans le labyrinthe en Y.**

Le déplacement des animaux a été enregistré par le système de vidéo-tracking SMART (Bioseb, France). Le pourcentage de temps passé dans le nouveau bras durant la phase de rappel a été calculé de la manière suivante : temps passé dans le nouveau bras / (temps passé dans le nouveau bras + temps passé dans le bras familier) (Dellu et al., 1992; Conrad et al., 1999) avec un pourcentage de hasard de 50%.

#### ***II.4. Reconnaissance d'objet***

Le test de reconnaissance d'un nouvel objet permet de mesurer la capacité des animaux à se souvenir d'un objet en observant l'exploration d'un nouvel objet lors de l'introduction de celui-ci par rapport à l'exploration d'un objet familier déjà présenté. Ce test est basé sur la curiosité des rongeurs pour l'exploration de la nouveauté. Des animaux avec une bonne mémoire de reconnaissance exploreront ainsi plus le nouvel objet que le familier. Il s'agit dans un premier temps de présenter aux souris deux objets identiques puis, après un certain délai, de remplacer un objet par un nouveau et d'observer le temps d'exploration de chacun des deux objets.

Ce test se déroule en trois phases : la phase d'habituation au contexte, la phase d'acquisition et la phase de rappel (**Figure 12**).

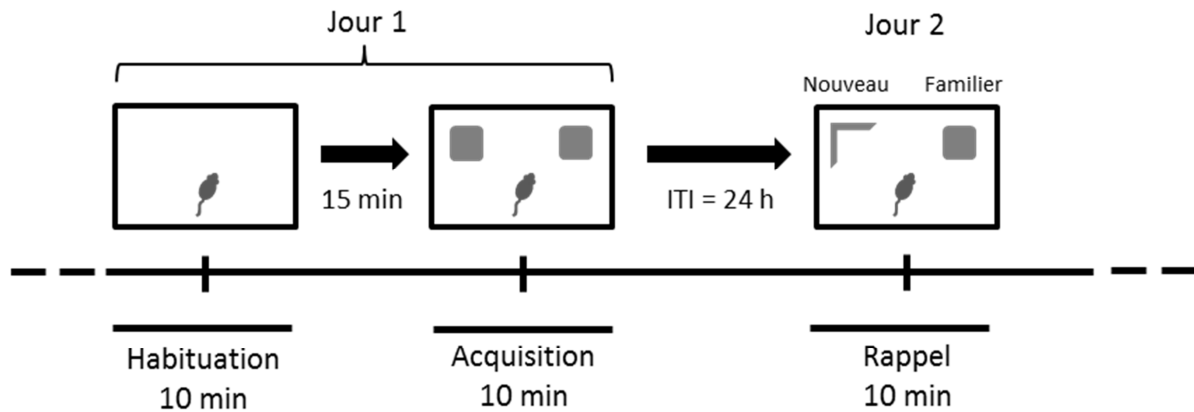
*Phase d'habituation.* Le dispositif est constitué d'une boîte aux parois blanches opaques de 25cm de large et 45cm de long et d'une hauteur de 40cm. La luminosité dans le dispositif est de 30 lux. Dans un premier temps, l'animal est présenté au dispositif sans objet. L'animal est introduit dans l'open-field sans objet et est libre d'explorer le milieu pendant 10 minutes. Cette phase permet de réduire l'aspect anxiogène du contexte. La souris est ensuite remise dans sa cage pendant 15 minutes.

*Phase d'acquisition.* Dans la deuxième étape, on présente deux objets identiques à l'animal. La souris est mise dans l'open-field (côté opposé aux objets) et peut explorer librement les deux objets identiques pendant une durée de 10 minutes. Les objets sont soit 2 piliers, soit 2 équerres.

*Phase de rappel.* Après un intervalle choisi de 24 heures on procède au test de reconnaissance. Pour cela, un des deux objets est remplacé par un autre (ex : pilier → équerre). L'animal est introduit dans le dispositif et peut explorer les deux objets, le familier et le nouveau, pendant 10 minutes. Le type d'objet ainsi que la position (droite ou gauche) a été alterné aléatoirement pour chaque groupe.

La préférence pour le nouvel objet est exprimée en pourcentage de temps passé à explorer le nouvel objet par rapport au temps total d'exploration des deux objets. On considère comme exploration le temps que passe la souris à toucher l'objet, le renifler ou être très proche de celui-ci.

Chaque phase a été enregistrée par caméra et le temps d'exploration a été quantifié en utilisant un programme d'évènements.



**Figure 12 : Procédure comportementale dans le test de reconnaissance d'objet.**

### III. Euthanasie des animaux et préparation des tissus

Les animaux ont été euthanasiés par dislocation cervicales puis décapitation. Le sang a été prélevé juste avant l'euthanasie par prélèvement à la joue. Les cerveaux ont été extraits du crâne puis les structures cérébrales (hippocampe, striatum et cortex préfrontal) ont été rapidement prélevées sur un hémisphère et immédiatement congelées dans de l'azote liquide et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment des analyses biochimiques et biomoléculaires. Pour réaliser les études immunohistochimiques, un hémisphère cérébral a été prélevé, lavé dans du tampon PBS (0,1M ; pH 7,4) puis post-fixé pendant 3 semaines dans du paraformaldéhyde 4% (avec renouvellement 1 fois par semaine). Ces demi-cerveaux ont ensuite été coupés à l'aide d'un vibratome (Leica VT 1000S) en coupes frontales sériées (12 séries) de  $50\mu\text{m}$  d'épaisseur. Ces coupes ont ainsi été récupérées dans du tampon PBS (0,1M ; pH 7,4), puis conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans une solution cryoprotectrice contenant du glycérol (20%) et de l'éthylène glycol (30%).

#### **IV. Études immunohistochimiques : Neurogenèse hippocampique adulte**

Au cours de notre deuxième étude nous nous sommes intéressés au nombre de neurones néoformés au niveau de l'hippocampe en utilisant la Doublecortine (DCX), une phosphoprotéine associée aux microtubules. Elle est exprimée précocement au cours de la différenciation neuronale, au niveau des neurones immatures.

##### ***IV.1. Immunohistochimie : marquage DCX***

Les coupes flottantes ont été lavées dans du tampon PBS puis traitées avec du méthanol contenant 0,5% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> afin de bloquer les peroxydases endogènes présentes dans les hématies.

Les coupes ont ensuite été lavées 4 fois dans le tampon pendant 10 min et incubées pendant 45 min avec du PBS-triton (0,3%) et du sérum normal de l'espèce produisant l'anticorps secondaire (3%) (Sérum d'Âne ; Abcys) afin de saturer les sites non spécifiques. Après élimination de la solution dite de "blocage", les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire (IgG chèvre anti-DCX ; Santa-Cruz) dilué au 1/1000e dans du tampon contenant du PBS-triton et du sérum normal (1%) sous agitation constante pendant 72h à 4°C. A l'issue de ces 72h, les coupes ont été à nouveau lavées dans du tampon PBS, puis incubées pendant 1h30 avec l'anticorps secondaire biotinylé dilué au 1/200e (IgG Âne anti-chèvre (Amersham)). Elles ont ensuite été rincées dans du PBS et incubées dans une solution de streptavidine-biotine pendant 1h30.

Après plusieurs rinçages dans un tampon Tris, l'activité peroxydase a été révélée en employant la 3,3-diaminobenzidine (DAB ; 50mg/ml) comme chromogène. Ainsi, les coupes ont été incubées avec une solution de DAB et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et ont été ensuite lavées dans du tampon Tris et du Tris-NaCl avant d'être montées sur lames gélatinées.

##### ***IV.2. Déshydratation et montage des coupes***

Après montage sur lames gélatinisées, les coupes ont ensuite été séchées pendant 24h puis déshydratées dans des bains successifs contenant des concentrations croissantes en éthanol (70°, 90°, 95°, 100°). Enfin, les coupes ont été imprégnées par un solvant (Histosol) et recouvertes d'une lamelle en utilisant un milieu de montage.

### ***IV.3. Comptage du nombre de cellules immunoréactives***

Le nombre de cellules immunoréactives dans le GD (DCX-IR) a été compté toutes les 6 sections de l'axe rostro-caudal de la formation hippocampique à l'aide d'un microscope optique muni d'un système de contraste de phase. Pour chaque section, toutes les cellules sont comptées dans les couches granulaires et sous-granulaires. De plus, les cellules DCX-IR présentant des prolongements ont été comptées afin de déterminer la proportion de cellules avec prolongements (nombre de cellules DCX-IR avec prolongements/nombre de cellules DCX-IR).

## **V. Études de biologie moléculaire : Quantification des ARNm par RT-qPCR en temps réel**

L'expression des gènes choisis a été mesurée dans l'hippocampe par la technique de RT-qPCR. Dans la première étude nous avons quantifié l'expression hippocampique des neurotrophines NGF et BDNF et de certaines kinases CaMKII, Akt, ERK1 et ERK2.

### ***V.1. Extraction des ARNs***

L'extraction des ARNs totaux a été réalisée à l'aide d'un kit d'extraction (TRIzol, Invitrogen, France) contenant du phénol et de l'isothiocyanate de guanidine. Les ARNs purifiés, suite à des séries de précipitations/lavages, ont été quantifiés et leur pureté a été vérifiée par dosage spectrophotométrique à l'aide du Nanodrop (Labtech, France). Par la suite, l'intégrité des ARNm a été vérifiée à l'aide d'un Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies) qui a permis de déterminer le ratio des ARNs ribosomiques 28S/18S grâce à une séparation électrophorétique.

### ***V.2. Rétro-transcription***

L'utilisation d'oligonucléotides et d'amorces aléatoires (Promega, France) a permis la rétro-transcription des ARNs en ADNc en présence de la transcriptase reverse ImPromII (Promega, France). Brièvement, 1µg d'ARNs totaux a été incubé pendant 15min à 37°C en présence de RNasine (Promega, France) et de DNase (Roche, France). Ensuite, une deuxième incubation de 10min à 75°C a été réalisée pour inactiver la DNase en présence d'amorces oligodT (Promega) et d'amorces aléatoires (Promega). Enfin, la reverse transcription a été réalisée pendant 60min à 42°C, dans un volume final de 20µl contenant du tampon de transcription inverse 1X, du MgCl<sub>2</sub>, des dNTP ainsi que la transcriptase reverse (200 unités).

### ***V.3. Amplification***

La PCR (Polymérase Chain Reaction) a été réalisée à l'aide d'un thermocycler LightCycler 480 (Roche Diagnostics, France) qui combine le processus d'amplification à la détection en temps réel des produits de PCR. Pour détecter les produits d'amplification, le kit LC 480 SYBR Green I Master a été utilisé. La réaction d'amplification a été réalisée dans des plaques de 96 puits dans un volume final de 20µl contenant 2,5ng d'ADNc, 0,5µM de chaque amorce amont et aval et le tampon LC 480 SYBR Green I Master (contenant le SYBR Green I, la Taq Hot Start polymerase, les dNTP et le MgCl<sub>2</sub>). Cette plaque a alors subi les 50 cycles du programme PCR suivant : dénaturation (6sec, 95°C), hybridation des amorces (10sec, 62°C), élongation (6sec, 72°C). La fluorescence du SYBRGREEN a été mesurée à la fin de chaque cycle, reflétant l'expression du gène dans la structure considérée. Les séquences des amorces amont et aval utilisées pour l'amplification de chaque gène sont présentées dans le **Tableau 2**.

### ***V.4. Quantification relative de l'expression des gènes étudiés***

La quantité d'ADNc, qui reflète la quantité initiale d'ARNm, n'était pas connue en valeur absolue mais sa proportion a été déterminée par rapport à l'expression de gènes de référence (Actin et GAPDH) dont nous avons préalablement vérifié que l'expression était stable dans nos conditions expérimentales. Le LightCycler 480TM d'un logiciel de quantification relative permettant pour chaque échantillon de reporter les Cp du gène de référence et du gène d'intérêt sur les gammes standards préalablement établies afin de calculer le niveau d'expression du gène d'intérêt par rapport au gène de référence, normalisé par rapport au calibrateur. L'utilisation de gammes standards a aussi permis de corriger les variations potentielles d'efficacité de PCR entre le gène de référence et le gène d'intérêt, et d'intégrer cette variation d'efficacité de PCR dans le calcul du ratio gène d'intérêt/gène de référence.

Gene name	Nucleotide sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)
<b>Actin</b>	F: AAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC R: AGGATGCAGAAGGAGATTACTGC	220
<b>GAPDH</b>	F: GAACATCATCCCTGCATCCA R: CCAGTGAGCTTCCCGTTCA	78
<b>Erk1</b>	F: TCCCCATAGCCTGAGTGATGAG R: CCATTCCAGAACGGTCTACCAGA	102
<b>Erk2</b>	F: TTCCCAAATGCTGACTCCAAAG R: AAGTCGTCCAACCTCCATGTCAAAC	179
<b>Akt</b>	F: CGACGTAGCCATTGTGAAGG R: AGGTGCCATCGTTCTTGAGG	98
<b>CaMKII</b>	F: AGATGTGCGACCCTGGAATGAC R: AGTGATGCGGATATAGGCGATGC	194
<b>BDNF</b>	F: AACCATAAGGACGCGGACTTG R: TTGACTGCTGAGCATCACCC	51
<b>NGF</b>	F: ATCAAGGGCAAGGAGGTGACAG R: GAGTCCAGTGTTTGGAGTCGATG	143

**Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées.**

F : Forward (amorce amont) ; R : Reverse (amorce aval).

## VI. Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard (SEM). Les données ont été traitées par des analyses de variance (ANOVA) avec mesures répétées (effet jour) ou à deux facteurs (âge et régime) suivi du test *post-hoc* de Fisher permettant de comparer entre eux plusieurs groupes expérimentaux pour une variable donnée. Un test-t a été utilisé pour comparer des valeurs à une valeur fixe de hasard. Les valeurs de  $p < 0,05$  ont été considérées comme statistiquement significatives.







## **PARTIE I**



**EFFET D'UNE SUPPLEMENTATION EN POLYPHENOLS SUR  
L'APPRENTISSAGE ET LA MEMOIRE ET LA NEUROGENESE ADULTE  
HIPPOCAMPIQUE AU COURS DU VIEILLISSEMENT**

**I. Introduction**

L'effet des polyphénols sur le déclin mnésique a été démontré à plusieurs reprises (Letenneur, 2004; Mandel and Youdim, 2004; Andres-Lacueva et al., 2005; Dinges, 2006; Haque et al., 2006; Letenneur et al., 2007; Spencer, 2007; Kaur et al., 2008; Williams et al., 2008; Krikorian et al., 2010a; Krikorian et al., 2010b; Dal-Pan et al., 2011a; Harada et al., 2011; Krikorian et al., 2012). Il semblait important de tester l'efficacité de l'extrait Neurophenol® sur différents tests d'apprentissage et de mémoire afin de valider son action bénéfique sur le déclin mnésique lié à l'âge. Des études ont montrées que la mémoire de reconnaissance pouvait être altérée par l'âge (Fahlstrom et al., 2011) ainsi que l'apprentissage et la mémoire spatiale (Barnes, 1979; Markowska et al., 1989; Uttl and Graf, 1993; Lai et al., 1995; Gallagher and Rapp, 1997; Rapp et al., 1997; Wilkniss et al., 1997; Bach et al., 1999; Gazova et al., 2013). Ces mémoires étant décrites comme hippocampo-dépendantes (Morris et al., 1982; Morris, 1984; D'Hooze and De Deyn, 2001; Dere et al., 2007) nous nous sommes intéressés aux potentielles modifications d'expression géniques au niveau de l'hippocampe ainsi qu'à la neurogenèse adulte hippocampique. Les neurotrophines jouent un rôle important dans les processus mnésiques en particulier en impactant sur la survie, et le développement des neurones (Allen and Dawbarn, 2006; Chao et al., 2006). De plus, des modifications d'expression des neurotrophines ont été observées chez l'animal âgé (Fischer et al., 1991; Phillips et al., 1991; Woolf et al., 2001; Michalski and Fahnestock, 2003; Peng et al., 2005; Calabrese et al., 2013). Il a été montré que certains polyphénols peuvent moduler l'expression de ces neurotrophines (De Nicolo et al., 2013; Rendeiro et al., 2013a; Rendeiro et al., 2013b). Les facteurs neurotrophiques peuvent également induire la différenciation des cellules progénitrices en neurones, un processus connu sous le nom de neurogenèse (Pham et al., 2002; Barnabe-Heider and Miller, 2003; Nguyen et al., 2009). La neurogenèse hippocampique adulte, réduite avec le vieillissement (Klempin and Kempermann, 2007), est directement liée aux processus cognitifs (Zhao et al., 2008; Stangl and Thuret, 2009). Il a en outre été montré que des suppléments en polyphénols pouvaient augmenter la neurogenèse hippocampique dans certaines conditions (van Praag et al., 2007; Harada et al., 2011).

## **II. Méthodologie**

Dans cette première partie nous avons étudié l'effet d'une supplémentation nutritionnelle en polyphénols de raisin et de bleuet (extrait Neurophenol®) de 14 semaines sur différents types de mémoires, sur l'expression hippocampique de neurotrophines et sur la neurogenèse. Pour cela, quatre groupes de souris ont été constitués. Des souris adultes et des souris âgées ont été nourries pendant 14 semaines avec un régime contrôle ou avec un régime enrichi en polyphénols. Nous avons évalué le comportement de type anxieux en utilisant le labyrinthe en croix surélevé dans le but de vérifier que le niveau anxieux des animaux ne pouvait pas influencer les résultats comportementaux. Nous avons ensuite évalué la mémoire à court terme en utilisant le labyrinthe en Y. La mémoire de reconnaissance a été mesurée dans le test de reconnaissance de nouvel objet. L'apprentissage spatial et la mémoire spatiale de référence ont été étudiés en utilisant le labyrinthe aquatique de Morris. L'expression hippocampique des neurotrophines BDNF et NGF a été mesurée par RT-qPCR et la neurogenèse hippocampique par immunohistochimie. Nous avons également relevé la mortalité de nos souris aux cours des différentes expériences. Enfin, la biodisponibilité des polyphénols de l'extrait a été mesurée dans le plasma et dans le cerveau des souris.

## **III. Principaux résultats**

Nous avons montré qu'une supplémentation en polyphénols de 14 semaines permettait de rétablir les capacités d'apprentissage spatial en labyrinthe aquatique et la mémoire de reconnaissance altérées chez la souris âgée. Nos résultats montrent que l'extrait Neurophenol® peut moduler l'expression de NGF au niveau hippocampique chez les animaux supplémentés adultes et âgés. De plus, nous avons montré que l'extrait Neurophenol® permettait d'augmenter la proportion de neurones immatures avec prolongements chez les souris âgées supplémentées. Les observations de mortalité suggèrent également que la supplémentation en polyphénols permet d'augmenter l'espérance de vie des souris. Enfin, les mesures de biodisponibilité montrent que certains polyphénols consommés sont retrouvés au niveau plasmatique mais également au niveau du cerveau des souris sous forme métabolisée ou native.

## **IV. Conclusion**

Ces résultats apportent des arguments puissants sur l'efficacité de l'extrait Neurophenol® contre le déclin mnésique lié au vieillissement. En effet, nous avons montré

que les animaux âgés recevant les polyphénols avaient des performances similaires à des animaux adultes contrairement aux animaux âgés non supplémentés. Cette étude montre également que les polyphénols de raisin et de bleuet peuvent moduler l'expression de NGF chez les animaux adultes et âgés ce qui pourrait expliquer en partie les résultats obtenus sur la neurogenèse montrant une augmentation du nombre de cellules neuronales immatures ayant des prolongements. Nous montrons également que l'extrait Neurophenol® pourrait augmenter l'espérance de vie. Enfin, nous apportons des arguments supplémentaires suggérant une action directe des polyphénols au niveau cérébral en montrant la présence de polyphénols dans le cerveau des souris.

Les résultats de cette première partie font l'objet d'une publication en préparation pour soumission.



## **A mix of grape and blueberry polyphenol-extracts improve learning, memory and hippocampal neurogenesis in aged mice**

BENSALEM J.<sup>1,2,3</sup>, GAUDOUT D.<sup>3</sup>, SERVANT L.<sup>1,2</sup>, DUDONNE S.<sup>4</sup>, DESJARDINS Y.<sup>4</sup>, LAYE S.<sup>1,2</sup>, LAFENETRE P.<sup>1,2\*</sup>, PALLET V.<sup>1,2\*</sup>, for the Neurophenols Consortium

1 Univ.de Bordeaux, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, Bordeaux, France.

2 INRA, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, Bordeaux, France.

3 Activ'Inside, Libourne, France

4 Institute of Nutraceuticals and Functional foods, Université Laval, Quebec,Quebec, Canada

**Correspondence:** Véronique Pallet

Nutrition and Integrative Neurobiology, UMR 1286 INRA – Université de Bordeaux,  
Bâtiment UFR de Pharmacie 2<sup>e</sup> tranche, 2<sup>e</sup> étage, case courrier 34, 146 rue Léo Saignat,  
33076 Bordeaux cedex, France.

Tel : +33 5 57 57 12 30 ; Fax: +33 5 57 57 12 27 ; E-mail : veronique.pallet@enscbp.fr



**Abstract**

During aging, learning and memory deficits are commonly observed associated with hippocampal synaptic plasticity impairments. Recent studies have highlighted the beneficial role of nutrition to prevent age-related memory decline and polyphenols have recently been identified as potential functional food candidates. They could indeed potentiate the signaling pathways of synaptic plasticity and learning and memory performances. The aims of this study were (i) to better characterize the learning and memory deficits observed in aged mice, (ii) to assess the effectiveness of a polyphenol-rich extract from grape and blueberry (Neurophenol<sup>TM</sup> extract) with high contents of flavonoids and stilbenes in the prevention of age-related cognitive decline and (iii) to better understand the neurobiological mechanisms underlying these effects. Learning and memory deficits of aged mice have been first highlighted in the novel object recognition task and in the Morris water maze task. In order to assess the effectiveness of nutritional polyphenols to delay the occurrence of age-related cognitive decline, adult and aged mice have been fed a polyphenol-enriched diet for 14 weeks. Our results show that polyphenols are able to prevent age-induced learning and memory deficits in both novel object recognition task and Morris water maze. To determine molecular mechanisms underlying these behavioral observations we have evaluated the hippocampal neurogenesis and neurotrophin expression in the hippocampus. We show that polyphenol-rich extract supplementation increase hippocampal NGF mRNA expression in both adult and aged supplemented animals. Moreover, we observed a decrease of newly generated immature neurons in aged mice. However, aged mice fed with the polyphenol-rich diet had a greater proportion of newly generated immature neurons with prolongations than aged control mice. Interestingly, mortality is decreased by polyphenols supplementation in aged mice. Some of polyphenols presents in the extract were also found in the plasma or in the brain of mice in native form or as metabolites which could be specific mediator of the extract effects. These data suggest that supplementation with polyphenols could thus be a potential nutritional way to prevent age-induced cognitive decline.

*Key words:* Novel object recognition, Morris water maze, aging, polyphenols, learning and memory, berries, NGF, neurogenesis, lifespan, bioavailability

## **Introduction**

Brain aging is associated with multiple morphological and neurochemical changes leading to a progressive and noticeable cognitive decline. Hippocampus integrity which is essential for proper functioning of long term memory is one of the brain structure particularly affected with aging. The relationship between hippocampal damages and alterations of episodic and spatial memory has been established in animals and human, (O'Keefe et al., 1975; Morris et al., 1982; Moser et al., 1995; Vargha-Khadem et al., 1997; Teng and Squire, 1999; de Hoz et al., 2005) and these types of memory are also altered with aging in animals (Lai et al., 1995; Rapp et al., 1997) but also in elderly (Uttl and Graf, 1993; Wilkniss et al., 1997; Gazova et al., 2013). The dentate gyrus of the hippocampus is one of the areas where neurons are generated throughout the lifespan (Abrous et al., 2005). It is well known that aging has a negative effect on hippocampal neurogenesis (Klempin and Kempermann, 2007; Drapeau and Nora Abrous, 2008). This is of first importance since hippocampal neurogenesis, i.e. integration of newborn neurons into the adult hippocampus circuitry, would be involved in memory processes (Zhao et al., 2008; Stangl and Thuret, 2009; Deng et al., 2010). Otherwise, it is now admitted that both short-term and long-term memories are controlled by changes at the molecular level in specific brain structures (Carew, 1996; Kandel, 2001; Sossin, 2008). Changes in long-term memory require synthesis of new mRNAs and proteins (Martin et al., 2000; Kelleher et al., 2004; Bramham and Wells, 2007). Neurotrophic factors are among the factors implicated in the control of adult neurogenesis, inducing differentiation of progenitor cells to form neurons (Pham et al., 2002; Barnabe-Heider and Miller, 2003; Nguyen et al., 2009). Thus, nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which belong to the same family, have similar properties and play a crucial role in the survival and development of specific peripheral and brain neurons (Allen and Dawbarn, 2006; Chao et al., 2006). The regulation of BDNF and NGF expression is important for long-term memory, particularly in aged animals, because they are linked with the modulation of synaptic plasticity (Fischer et al., 1991; Poo, 2001; Woolf et al., 2001; Bramham and Messaoudi, 2005; Calabrese et al., 2009). Indeed, impaired expression of hippocampal long term potentiation (LTP) was clearly associated with deficiency in this neurotrophic factors (Maguire et al., 1999; Hennigan et al., 2009). Moreover, a decrease in mRNAs and proteins of BDNF and pro-BDNF have been reported in normal aging but also in Alzheimer's disease (Phillips et al., 1991; Michalski and Fahnstock, 2003; Peng et al., 2005; Calabrese et al., 2013).

The age-related decline in neurogenesis and more in general, in brain function, is not an irreversible process and lifestyle factors, mainly diet, may prevent or delay the age-related memory decline. Among the functional foods beneficial for brain, it has been reported that fruits and vegetables rich in polyphenols could retard age-related physiological and functional deficits (Joseph et al., 2005; Gomez-Pinilla, 2008; Queen and Tollefsbol, 2010; Murphy et al., 2014). Polyphenols are complex metabolites exclusively synthesized in vegetal reign. The four main families are flavonoids, phenolic acids, stilbenes and lignans (Manach et al., 2004). A daily consumption of blueberry or grape juices -berries rich in polyphenols- for 12 weeks improved episodic memory performances of older adults (Krikorian et al., 2010a; Krikorian et al., 2010b; Krikorian et al., 2012). Similar results are reported in animals studies that have highlight the beneficial effects of polyphenols, particularly of flavonoids, flavanols and anthocyanins but also of resveratrol, on the age-related hippocampal-dependent memory decline (Joseph et al., 1999; Andres-Lacueva et al., 2005; van Praag et al., 2007; Williams et al., 2008; Abraham and Johnson, 2009; Li et al., 2009a; Harada et al., 2011; Rendeiro et al., 2013b; Tan et al., 2014).

Neurobiological mechanisms of action of Polyphenols remain unclear but it is now admitted that they are able to modulate cellular and molecular processes involved in learning and memory. Indeed, they may impact on neuronal signaling pathways involved in synaptic plasticity and LTP (Williams et al., 2004; Schroeter et al., 2007; Spencer, 2007; Vauzour et al., 2007; Rendeiro et al., 2009). Recent studies have highlighted the beneficial effect of flavonoid consumption on spatial memory and the activation of BDNF and NGF signaling pathways in rats hippocampus (Williams et al., 2008; Li et al., 2009a; Li et al., 2009b; De Nicolo et al., 2013; Rendeiro et al., 2013a; Rendeiro et al., 2013b). Resveratrol have also been shown to increase hippocampal neurogenesis in rodent model (An et al., 2008; Harada et al., 2011; Dias et al., 2012; Carey et al., 2014).

The aim of this study is first to investigate the effects of a nutritional supplementation with a mix of polyphenol-rich extracts from blueberry and grape, exhibiting high content in flavonoids and stilbenes, on age-related memory deficit, using two behavioral tests targeting hippocampal memory. Second, we assess the neurobiological correlates underlying the hippocampal impact targeting hippocampal neurogenesis and gene expression of neurotrophic factors.

## Materials and Methods

**Animals.** For this study 67 adult (6-week old) and 67 aged (16-month old) male C57Bl/6J mice were purchased from Janvier (St Berthevin, France). They were singly housed in a room with a constant airflow system, controlled temperature (21-23°C), and a 12h light/dark cycle. Mice were given *ad libitum* access to food and water. All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC) and the French national Committee (87/848) recommendations, and have been approved by the Animal Care and Use Committee of Bordeaux under the N°5012085-A.

**Intervention Diet and Polyphenols Extract.** Mice were randomly divided into four experimental groups. One group of adult mice and one of aged mice were fed with a control diet exempt of polyphenols (INRA, Jouy-en-Josas), whereas the two other groups of adult mice and old mice received a polyphenols-enriched diet (INRA, Jouy-en-Josas) containing 0.51% of Neurophenol<sup>TM</sup> extract (provided by Activ'Inside, France). The composition of the control diet was the same as the polyphenol-enriched diet, except for polyphenols content. Diets started as soon as mice arrived in the laboratory (i.e., at the age of 6 weeks for adult mice and 16 months for aged mice) and continued throughout the entire experiment i.e. 14 weeks (12 weeks before behavioral testing; 6 weeks for bioavailability measurements). The Neurophenol<sup>TM</sup> extract (Activ'Inside, France) provide flavonoids (monomers, oligomers, flavonols, anthocyanidins, and phenolic acids) and resveratrol from Grape Extract (fruit, *Vitis vinifera*) (Activ'Inside, France) and Wild Blueberry Extract (fruit, *Vaccinium angustifolium*) (NutraCanada, Canada).

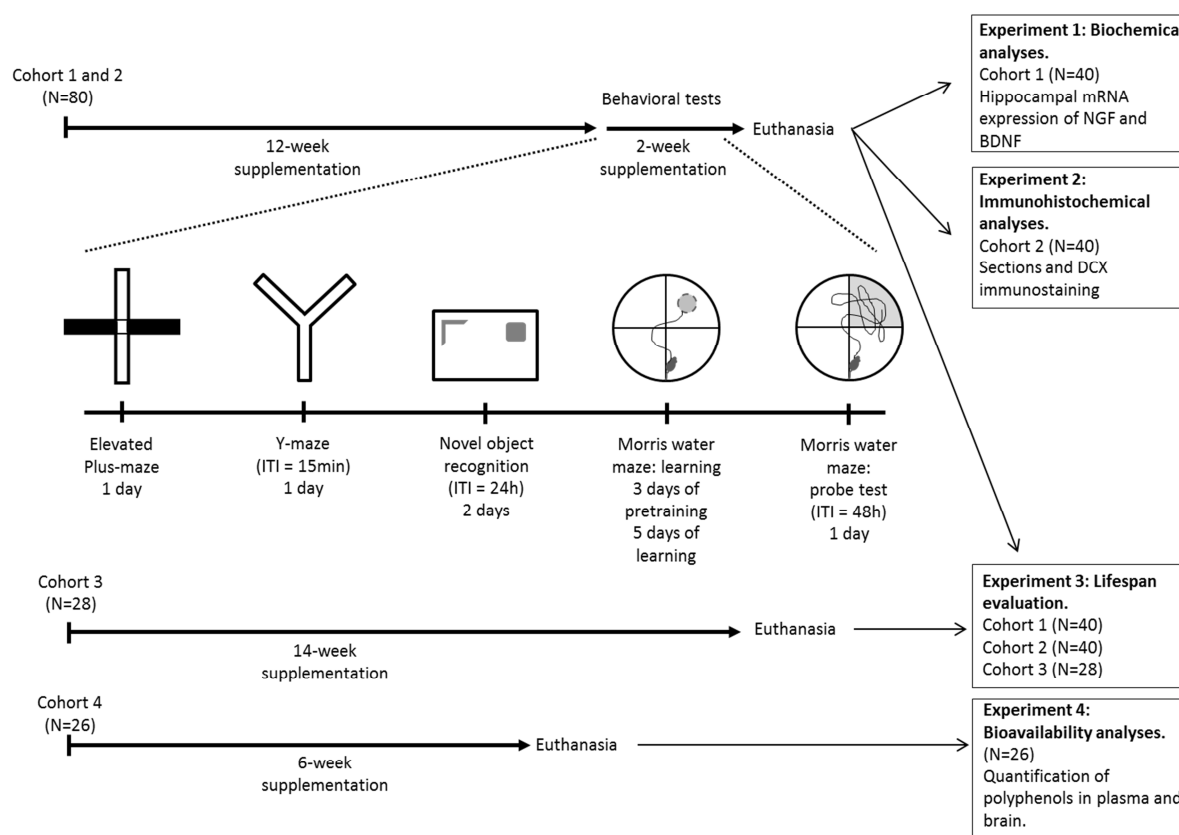
## Experimental design.

**Behavioral and biochemical measurements.** 40 adult and 40 old mice were fed a control diet or supplemented with a polyphenols-enriched diet during 14 (12 weeks before behavioral testing). We have examined the effects of a 14-week polyphenols supplementation on anxiety (see Supplementary data), short term memory (see Supplementary data), novel object recognition and spatial learning and memory in the Morris water maze. One hour after the

probe test, all mice were euthanized and half of the brains were dissected in order to measure hippocampal mRNA expression by quantitative RT-PCR and the other half was dissected and postfixed for hippocampal neurogenesis analysis by immunohistochemistry (**Figure 1**).

**Lifespan evaluation** Lifespan was evaluated in three separate cohorts (N=40, N=40, N=28) in mice supplemented or not with the polyphenols-enriched diet during 14 weeks. From the beginning of the experiment to the end, each dead was recorded to perform a Kaplan-Meier survival analysis (**Figure 1**).

**Bioavailability.** In order to evaluate the presence of polyphenols in plasma and brain, 6 control mice (3 adult and 3 aged) and 20 supplemented mice (10 adult and 10 aged) were fed with the control diet or the polyphenols-enriched diet for 6 weeks. Plasma was collected at the end of the experiment and brain dissected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assay. Specific flavanols metabolites were measured by UPLC-MS/MS in the plasma and in the brain (**Figure 1**).



**Figure 1 | Experimental design.** Two cohorts of mice were fed with a control diet or a polyphenols enriched diet (0.51% Neurophenol) for 12 weeks until the behavioral tests. Anxiety-like behavior was evaluated in the elevated plus maze. Then, learning and memory were assessed using the Y-maze, the novel object recognition task and the Morris water maze task. At the end of the experiment (14 weeks of supplementation) mice were euthanized and hippocampi were dissected to carry out biomolecular measurements. Two other cohorts were used in order to evaluate polyphenols effect on lifespan and to quantify the presence of polyphenols in the plasma and the brain (6-weeks supplementation).

## Behavioral tests

**Novel object recognition.** The novel object recognition test measures the ability to remember an object by observing reaction to the introduction of a novel object compared to a previously viewed object; animals with intact recognition memory will spend more time exploring a novel object than a familiar one. The experimental apparatus consisted of a white rectangular open field (45cmx25cmx40cm). The test consisted of three sessions. During the first session, mice were habituated to the open field in the absence of objects and allowed to explore the environment for 10min. Mice were then return to their home cage for 15min before the second session. During this second session, mice were placed in the same box but now with two identical objects. Mice were allowed to freely explore the environment and the objects for 10min. After 24h, mice were placed back in the open field for the testing phase. This time, one of the objects was replaced by a novel one. Mice were allowed to explore for 15min (**Figure S1**). Preference for the novel object was expressed as the percent time spent exploring the novel object relative to the total time spent exploring both objects. The objects consisted of two pillars or two brackets. The identity of the objects, which one was novel or familiar, as well as the spatial location (whether the novel object was placed on the left or right side during the test session) of each object was balanced between groups. In both tasks, objects were rinsed with ethanol between trials and before the first trial. It was considered exploration of the objects when mice were facing and sniffing the objects within very close proximity and/or touching. Each phase was video recorded and exploratory time was measured using an event program. One aged control mouse was excluded from the analysis because it did not explore objects.

**Spatial learning and reference memory in the Morris water maze.** Mice were tested in a Morris water maze (150cm diameter, 50cm high) filled with white water (22°C) with distal extramaze cues. Before being tested, animals were handling 1min/day for two days. Mice were first submitted to two familiarization days where they have to find a visible platform in center of a small pool (60cm diameter) with curtains around, to familiarize mice with swimming and to avoid jump during training. Then, to evaluate visuomotor deficits, they were tested in a cued task in the Morris water maze with curtains around. In this task, mice have to found the submerged platform marked with a cued over for 6 trials (90s cut-off). During training, animals were required to locate the submerged platform by using distal extramaze cues. They were trained for six trials per day (90s cut-off with an intertrial interval of 5min, starting from four different start points randomized every day) for 5 consecutive days. Latency and distance to find the platform were analyzed by Imetronics videotrack system (France). Failing to search the platform after five training days, weak or presenting thigmotaxic behavior, one adult control mouse, one adult supplemented mouse, and six aged supplemented mouse were excluded from the experiment. Spatial memory was evaluated 72 hours after the last training session after the platform was removed, by the percentage of time swimming in the quadrant where the platform was located during training (target quadrant) using the Panlab SMART system (Bioseb, France) (**Figure S2**).

**Tissue preparation.** One hour after the probe test, mice were transferred individually to an adjacent room of their, were euthanized by cervical dislocation and decapitated. Ten brains per group were assigned for later measurements: i.e., 40 for PCR analyzes and 40 for DCX immunohistochemistry. For PCR analysis, hippocampi were rapidly dissected and frozen with liquid nitrogen and then stored at -80°C until assay. In order to analyze hippocampal neurogenesis by immunohistochemistry, the dissected brains were washed with 0.9% sodium chloride and emerged in 4% paraformaldehyde. After a 3-week postfixation period, 50µm coronal sections were cut on a vibratome (Leica).

**Real-Time PCR analysis of gene expression in the hippocampus.** The half of the hippocampus was used to measure gene expression. Extraction of RNA was conducted using TRIzol reagent (Invitrogen, France) according to the manufacturer's instructions. The integrity of the purified RNA was verified using the RNA 6000 Nano LabChip kit in combination with the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, France). The concentrations of RNA were determined by using a Nanodrop ND-1000 (Labtech, France). Using oligodT and random primers (Promega, France), cDNA was synthesized from 1µg of RNA with ImPromII reverse transcriptase (Promega, France) according to the manufacturer protocol. The real-time PCR was performed using the LightCycler 480 system with a 96-well format (Roche Diagnostics, Germany) in a volume of 20µL, containing 1X LightCycler 480 SYBR Green I Master solution, 0.5µM of each primer and 6µL of cDNA. The forward and reverse primer sequences are summarized in **Table 1**. The results are expressed as the target/reference ratio divided by the target/reference ratio of the calibrator.

Gene name	Nucleotide sequence 5'-3'	Amplicon Size (pb)
GAPDH	F: GAACATCATCCCTGCATCCA	78
	R: CCAGTGAGCTTCCCGTTCA	
NGF	F: ATCAAGGGCAAGGAGGTGACAG	143
	R: GAGTTCCAGTGTTTGGAGTCGATG	
BDNF	F: AACCATAAGGACGCGGACTTG	51
	R: TTGACTGCTGAGCATCACCC	

**Table 1 | Primers used for LightCycler RT-qPCR.** Sequences are shown for forward (F) and reverse (R) primers. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like; NGF, Nerve growth factor; BDNF, brain derived neurotrophic factor.

**Immunohistochemistry.** Free-floating sections were processed with a standard immunohistochemical procedure (Lemaire et al., 2006). A one-in-ten section was treated for doublecortin (DCX) immunoreactivity using a goat polyclonal antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) and a biotinylated donkey anti-goat secondary antibody (1:200, Amersham). All sections were processed in parallel, and immunoreactivities were visualized by the biotin-streptavidin technique (ABC kit, Dako) by using 3,3-diaminobenzidine as chromogen. The number of immunoreactive (IR) cells in the left Dentate Gyrus (DG) was estimated by using a modified version of the optical fractionators method with a systematic random sampling of every 10 sections along the rostro caudal axis of the DG. On each section, IR cells in the granular and subgranular layers of the DG were counted with a 100 × microscope objective (Lemaire et al., 2006) and among them, IR cells with prolongations were quantified. Results were expressed as the total number of DCX-IR cells in the whole DG or in percentage of DCX-IR cells with prolongations. Two mice were excluded from the analysis because one of

them did not finish the water maze training (weak) and the other because no marking was observed.

**Lifespan analysis.** For this analysis, mice's dead of natural causes and the date of death were recorded in three different experiments to limit intra-experiment variations. The two first measurements were performed on mice which have performed behavioral tasks until euthanasia for dissection (N=40, N=40). In a third experiment, mice did not perform behavioral task (N=28). The observations were made from the beginning of the supplementation to the euthanasia (12 weeks before the beginning of the behavioral tasks and 14 weeks until the end of the experiment). A Kaplan-Meier survival analysis was performed to evaluate the impact of age and polyphenols on survival.

**Bioavailability.** To evaluate the presence of polyphenols in plasma and brain, 6 control mice (3 adult and 3 aged) and 20 supplemented mice (10 adult and 10 aged) were fed with the control diet or the polyphenols-enriched diet for 6 weeks. Plasma was collected at the end of the experiment and brain dissected and stored at -80°C until assay. Specific flavanols metabolites were measured by UPLC-MS/MS in the plasma and in the brain.

**Statistical analysis.** Elevated plus-maze, Y-maze, novel object recognition, swim speed, probe test comparisons, PCR and neurogenesis data were analyzed using a 2-way ANOVA (effect of age and diet) followed by a *post-hoc* Fisher PLSD test. Y-maze, object recognition and probe test comparisons of each group with chance level (50% or 25%) have been performed with a one sample t-test. Spatial learning analysis was analyzed using a 3-way ANOVA with repeated measures (effect of age, diet and days) followed by a *post-hoc* Fisher PLSD test. Lifespan analysis was made using a Kaplan-Meier survival analysis. Bioavailability comparison between aged control and aged supplemented mice were analyzed by a one-way ANOVA. All results were expressed as mean  $\pm$  SEM.

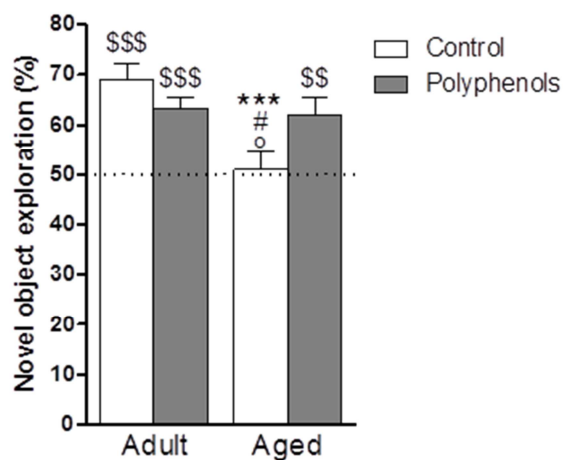
## Results

### 1. Effects of age and polyphenol-rich diet on Novel object recognition

Recognition memory was evaluated in the novel object recognition task. A 2-way ANOVA on the percent time spent exploring the novel object revealed an age effect [F(1,35)=8.895,  $p < 0.01$ ], no diet effect [F(1,35)=0.733, ns] and an interaction age x diet [F(1,35)=6.827,  $p < 0.05$ ]. Post-hoc analysis revealed that aged mice spent significantly less time on the novel object than adult control ( $p < 0.001$ ), adult supplemented ( $p < 0.05$ ) and aged mice supplemented with polyphenols ( $p < 0.05$ ) (**Figure 2**). Another method of examining performance in the novel object recognition task is to compare testing trial performance to chance level performance (50%). A mouse with a good object recognition memory will spend more than 50% of its time exploring the novel object in the testing trials. Adult control, adult supplemented and aged supplemented mice performed at levels greater than chance during the testing phase whereas aged control mice did not perform above chance (adult control:  $p < 0.001$ ; adult supplemented:  $p < 0.001$ ; aged control: ns; aged supplemented:  $p < 0.01$ ) (**Figure 2**). Indeed, analysis of the preference for the novel object (percent time spent exploring the novel object relative to the total time spent exploring both objects) indicated that aged mice fed control diet spent significantly less time exploring the novel object in the testing trial compared to adult control mice. Moreover, similarly to the adult control mice, aged mice fed with the polyphenol-rich diet spent more time on the novel object than the familiar.

**Figure 2 | Effects of 14 weeks of polyphenols supplementation on novel object recognition.**

Analysis of the preference for the novel object (percent time spent exploring the novel object relative to the total time spent exploring both objects). Aged mice under control diet showed a significant decrease in time spent on the novel object in the testing trial compared to adult control mice. Aged mice fed with the polyphenols-rich diet spent more time in the novel object than the familiar similarly to the adult control mice. Adult mice under control diet or polyphenols-rich diet spent preferentially more time exploring the novel object than the familiar object. The dotted line corresponds to chance level (50%). \*\*\* $p < 0.001$  aged control vs adult control; # $p < 0.05$  aged control vs adult polyphenols; °  $p < 0.05$  aged control vs aged polyphenols; \$\$\$  $p < 0.001$  vs chance level; \$\$  $p < 0.01$  vs chance level.  $n = 9-10$  per group.

**2. Effects of age and polyphenol-rich diet on spatial learning and memory**

To evaluate their visuo-motor capabilities mice were first trained to find a visible platform in the Morris water maze without distal cues. The ANOVA on swim speed revealed an age effect [ $F(1,68) = 25.792$ ,  $p < 0.05$ ], with no effect of diet [ $F(1,68) = 1.704$ , ns] and no interaction age x diet [ $F(1,68) = 0.022$ , ns] (data not shown). Indeed, aged mice swim slower than adult mice, whatever their diet. As the latency to reach the platform is dependent on the swimming speed, the distance covered to reach the platform has been chosen as a more appropriate measure to show the acquisition rate for this cued task and for spatial learning.

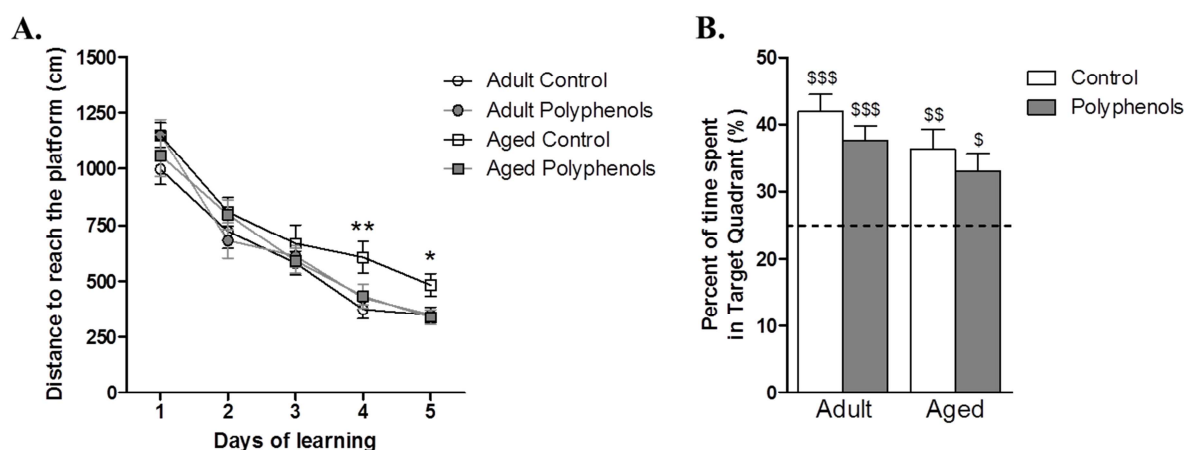
A 2-way ANOVA on the distance to reach the visible platform indicated no effect of age [ $F(1,68) = 0.336$ , ns], no effect of diet [ $F(1,68) = 4.154E-4$ , ns], and no age x diet interaction [ $F(1,68) = 0.625$ , ns] suggesting that all groups travelled similar distances to reach the visible platform and that all groups had similar visual capabilities.

One day later mice were trained in the spatial version of the Morris water maze to test the effects of age and polyphenols on spatial learning and memory. A 3-way ANOVA on the distance to reach the platform along the five days of training showed a day effect [ $F(4,272) = 91.510$ ,  $p < 0.0001$ ], an age effect [ $F(1,68) = 4.655$ ,  $p < 0.05$ ], no diet effect [ $F(1,32) = 4.182$ ,  $p < 0.05$ ] but a interaction age x diet [ $F(1,68) = 4.662$ ,  $p < 0.05$ ] (**Figure 3A**). Thus, distance to reach the platform decreased significantly over the five days indicating that all groups learned the platform location. Post-hoc analysis revealed that aged control mice travelled significantly longer distance to find the platform than adult control and supplemented mice (adult control vs aged control:  $p < 0.005$ ; adult supplemented vs aged control:  $p < 0.05$ ), revealing spatial learning deficits. Moreover, aged mice receiving polyphenol-rich diet had better performances than aged mice under control diet (aged supplemented vs aged control:  $p < 0.05$ ). No diet effect was observed on adult mice. A separate analysis on each day revealed that aged mice had significant longer distance to reach the



platform than the other groups on day 4 and day 5 (day 4: adult control vs aged control:  $p < 0.01$ , adult supplemented vs aged control:  $p < 0.05$ , aged supplemented vs aged control:  $p < 0.05$ ; day 5: adult control vs aged control:  $p < 0.05$ , adult supplemented vs aged control:  $p < 0.05$ , aged supplemented vs aged control:  $p < 0.05$ ) (**Figure 3A**).

Forty eight hours after the last training session, spatial memory was evaluated by performing a probe test. The platform was removed from water and mice were introduced in the maze for 60 seconds. One sample test comparing to the chance level (25%) revealed that all groups swam significantly more time in the target quadrant (adult control:  $p < 0.0001$ ; adult supplemented:  $p < 0.0001$ ; aged control:  $p < 0.01$ ; aged supplemented:  $p < 0.05$ ). Besides, a 2-way ANOVA performed on the percentage of time spent in the target quadrant revealed no effect of age [ $F(1,68)=3.716$ , ns], no effect of diet [ $F(1,68)=2.047$ , ns] and no interaction age x diet [ $F(1,68)=0.035$ , ns], suggesting that all four groups remembered as well the location of the platform (**Figure 3B**).

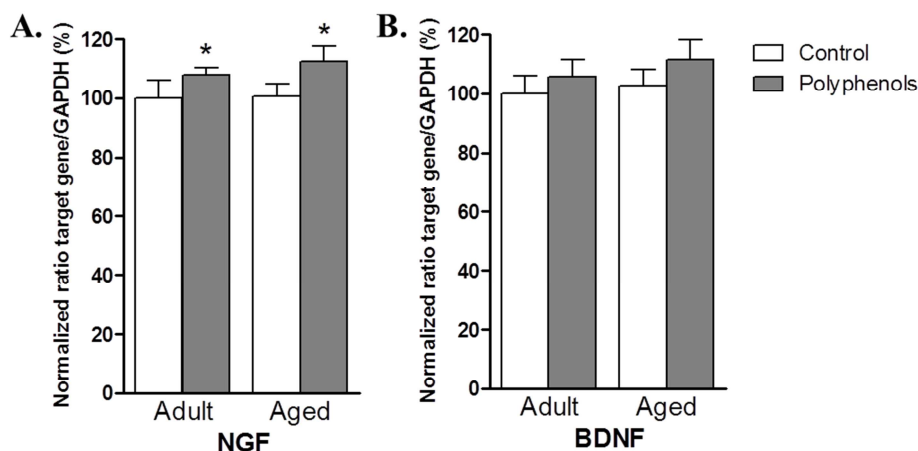


**Figure 3 | Effects of 14 weeks of polyphenols supplementation on spatial learning (A) and memory (B).** (A) Distance covered to reach the hidden platform over the 5 consecutive days of spatial learning (spatial learning; blocks of trials for each training day are averaged). Aged control mice exhibit longer distance compared to adult mice to reach the platform during acquisition whereas aged mice fed with the polyphenols enriched diet travel the same distance to reach the platform than adult mice. The main differences appear on day 4 and day 5 of the learning phase. \*\* $p < 0.01$  vs adult control; \* $p < 0.05$  vs adult control. (B) Percentage of time spent by mice in the target quadrant (Probe test). The dotted line corresponds to chance level (25%). All groups can remember the platform location spending more time in the target quadrant. \$\$\$  $p < 0.001$ ; \$\$  $p < 0.01$ ; \$  $p < 0.05$  vs chance level.  $n = 14-20$  per group.

### 3. Effects of age and polyphenol-rich diet on hippocampal gene expression

To study the neurobiological mechanisms underlying the behavioral improvements in polyphenol-fed mice, we tested whether age and polyphenol-rich diet can modulate expression of some hippocampal plasticity genes and particularly focusing on neurotrophins such as BDNF and NGF, known to play an important role in learning and memory and potentially modulated by polyphenols. A 2-way ANOVA performed on the mRNA expression of hippocampal *NGF* revealed a diet effect [ $F(1,36)=4.402$ ,  $p < 0.05$ ]: indeed, an increase in mRNA *NGF* levels was observed both in adult and aged mice fed with a polyphenol-rich diet

(Figure 4A). However, no effect of age or diet was found on the *BDNF* mRNA levels (Figure 4B).



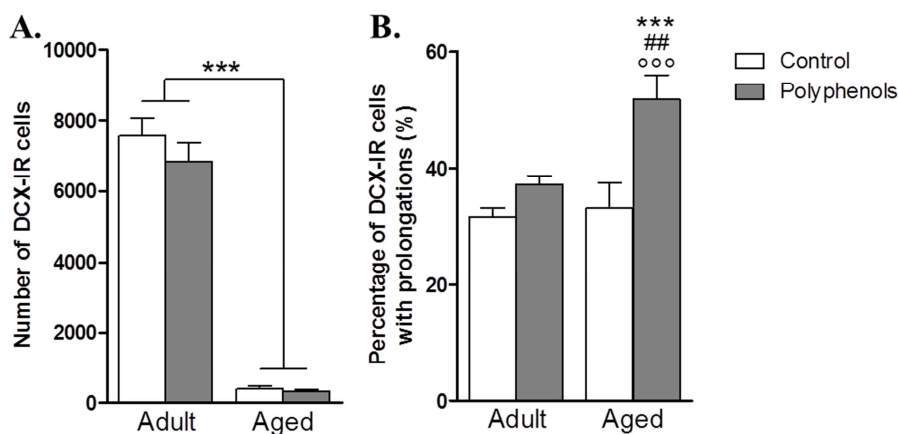
**Figure 4 | Effects of polyphenols supplementation on mRNA expression of hippocampal plasticity-related genes.** (A) Polyphenols supplementation increased significantly hippocampal NGF mRNA expression in both adult and aged mice. \* $p < 0.05$  Diet effect.  $n = 10$  per group. (B) Nor age or polyphenols supplementation did not modify hippocampal BDNF mRNA expression.  $n = 10$  per group.

#### 4. Effects of age and polyphenol-rich diet on hippocampal neurogenesis

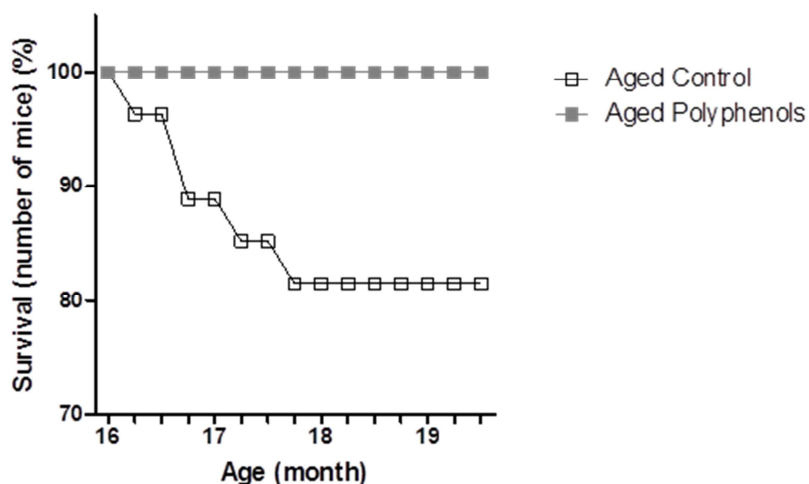
A 2-way ANOVA on the number of DCX-immunoreactive cells revealed a significant age effect [ $F(1,34) = 340.491$ ,  $p < 0.0001$ ], but no diet effect [ $F(1,34) = 1.167$ , ns] and no age x diet interaction [ $F(1,34) = 0.760$ , ns] indicating that aged mice possessed less newly generated immature neurons than adult mice whatever their diet (Figure 5A). However, a 2-way ANOVA analysis on the number of these DCX-IR cells possessing dendritic prolongations, indicator of the cell maturation level, revealed an age effect [ $F(1,34) = 6.375$ ,  $p < 0.05$ ], a diet effect [ $F(1,34) = 14.278$ ,  $p < 0.001$ ] and an interaction age x diet [ $F(1,34) = 4.179$ ,  $p < 0.05$ ]. Fisher's post-hoc analysis revealed that aged mice fed with the polyphenol-rich diet had a greater proportion of newly generated immature neurons with prolongations than the other groups (adult control vs aged supplemented:  $p < 0.0001$ ; adult supplemented vs aged supplemented:  $p < 0.01$ ; aged control vs aged supplemented:  $p < 0.001$ ) (Figure 5B).

#### 5. Effects of age and polyphenol-rich diet on lifespan

In order to evaluate the potential effect of the polyphenol-rich diet on the lifespan, survival of mice were recorded along three experiments ( $n = 27$  per group) from the beginning of the supplementation to the end (14 weeks). As no adult mice died in our experiments we have focused our analysis on aged mice. A Kaplan-Meier survival analysis revealed a difference on mortality between aged control mice and aged supplemented mice ( $p < 0.05$ ). Our results showed that 19 percent of aged mice fed with control diet died from natural causes, between 16 month-old and 19.5 month-old. Interestingly aged mice fed with polyphenol-rich diet didn't died at this age range, before the age of 19 month-old, in our conditions (Figure 6).



**Figure 5 | Effects of polyphenols supplementation on neurogenesis.** Analysis of the number of DCX-immunoreactive cells in the hippocampus. Age decrease significantly the number of newly generated immature neurons in the hippocampus (A). \*\*\* $p < 0.0001$  Age effect. Aged mice under polyphenols-rich diet had a greater proportion of newly generated immature neurons with prolongations than the other groups (B). \*\*\* $p < 0.0001$  vs adult control; ##  $p < 0.01$  vs adult polyphenols; °°°  $p < 0.001$  vs aged control.  $n = 9-10$  per group.



**Figure 6 | Effects of 14 weeks of polyphenols supplementation on lifespan.** Survival of aged mice from the beginning until the end of the 14 weeks of the supplementation. Aged mice fed with polyphenols didn't die during this observation period whereas mortality of aged mice under control diet reached 18.5185 percent. Kaplan-Meier survival analysis:  $p < 0.05$ .  $n = 54$  per group.

## Discussion

The aim of this study was to evaluate in mice potential beneficial effects of a mix of polyphenol-rich extracts consumption on hippocampal dependent age-related memory deficit and to investigate the neurobiological mechanisms underlying the behavioral observations. First, we showed that 19 month-old mice exhibited memory impairment in the novel object recognition task, and a learning deficit in the Morris water maze. However, neither age-related anxiety-like behavior (**Figure S3**) nor short term memory modifications evaluated in the Y maze (**Figure S4**) were observable in aged mice. Interestingly the polyphenol extract

enriched diet, administered during 14 weeks, is able to prevent the age-related alterations of memory performances of aged mice. Furthermore, whatever the diet consumed by mice, control or polyphenol-rich diets, age led to a severe decrease in neurogenesis. But, aged mice receiving the polyphenol-rich diet had a significant greater proportion of newly generated immature neurons with prolongations. Molecular analysis showed an increased expression of hippocampal NGF mRNA expression in both adult and aged mice fed with polyphenols. Finally, surprisingly, chronic consumption of a mix of blueberry and grape extracts increased lifespan, since animals submitted to enriched diet died less before 19 months, than animals fed the non-supplemented diet.

Previous studies have reported that polyphenols could delay age-related physiological and functional deficits (Mandel and Youdim, 2004; Andres-Lacueva et al., 2005; Joseph et al., 2005; Spencer, 2007; Gomez-Pinilla, 2008; Shukitt-Hale et al., 2008; Abraham and Johnson, 2009; Spencer, 2009; Queen and Tollefsbol, 2010; Dal-Pan et al., 2011b; Harada et al., 2011). In the present study we have supplemented mice with polyphenol-rich extract incorporated in food. The different families of polyphenols present in the Neurophenol<sup>TM</sup> extract are known to be effective on cognitive functions in particular flavanols (van Praag et al., 2007; Rendeiro et al., 2013b), anthocyanins (Williams et al., 2008; Shan et al., 2009; Rendeiro et al., 2013a; Rendeiro et al., 2013b; Tan et al., 2014) and resveratrol (Abraham and Johnson, 2009; Dal-Pan et al., 2011a; Harada et al., 2011). Contrary to what we observed in aged mice under control diet, aged mice fed the polyphenol-rich diet display learning and memory performances comparable to that of adult. Indeed they learned the position of the platform in the Morris water maze as quickly as adult mice and could well discriminate the novel object in the novel object recognition task. These results suggest that the extract can prevent or retard the development of age-related learning and memory deficits. However, polyphenol consumption did not modify the performances of adult animals in our conditions, contrary to what was already observed in other studies (van Praag et al., 2007; Papandreou et al., 2009; Rendeiro et al., 2012; Rendeiro et al., 2013a).

Evaluation of the object recognition memory depends on the rodent instinctive tendency to explore novel items. It is based on the capacity of animals to memorize an object that was presented to him and consists to compare the animal exploration of a novel object with that of the familiar object previously seen. Thus, control animal spend more time exploring the novel object, suggesting that the familiar object was recognized (Ennaceur and Delacour, 1988; Dix and Aggleton, 1999). This task also allows to assess object recognition on a long-term memory scale (up to 24 h). The anatomical basis for the exact process that underlies recognition memory is still under investigation. Some studies have already characterized the important role of the hippocampus for both recollection and familiarity processes (Mumby, 2001; Buffalo et al., 2006; Rossato et al., 2007; Squire et al., 2007). Its role in the novel object recognition task in rodents was established by different means (Dere et al., 2007) such as hippocampus lesions (Clark et al., 2000; Mumby et al., 2002) or temporary inactivation of neuronal activity in the dorsal hippocampus (Hammond et al., 2004). Fewer data exist on memory deficits and changes in learning ability during aging of mice compared to corresponding data available for the rat. While elderly mice were able to discriminate a novel object from a familiar one within the working memory time window they were impaired when the delay was extended to 24 h (Fahlstrom et al., 2011). In the present study, we used the object recognition task to test memory consolidation (Bevins and Besheer, 2006), and data obtained on old mice indicate an impairment of recognition memory. In our study, we showed that polyphenols consumption prevented the development of deficits observed in control aged mice. This is consistent with other studies showing beneficial effects of polyphenols on novel object recognition in rodents (Yokozawa, 2011; Yu et al., 2013;

Carey et al., 2014). Interestingly, Yokozawa et al. have shown that proanthocyanidins, a kind of polyphenols present in our tested extract, are able to reverse novel object recognition memory deficits in senescent accelerated mouse model (Yokozawa, 2011).

In order to confirm the hippocampal impact of polyphenols in our model, we have also studied hippocampal-dependent learning and memory in a more usual task in the Morris water maze. It is a spatial reference memory task which was a widely used laboratory tool to investigate hippocampal-dependent spatial learning and memory in rodents (Morris et al., 1982; Morris, 1984; D'Hooge and De Deyn, 2001). Previous studies have shown that this task is particularly sensitive to cognitive deficits related to aging (Frick et al., 1995; Lindner, 1997; Wolff et al., 2002; de Fiebre et al., 2006). In the present study, the path length traveled by adult mice to reach the platform during the acquisition phase became progressively daily shorter, indicating the animals learned the platform position. Aged mice displayed deficits in spatial learning, they travelled a significant longer average distance than adult mice to reach the platform, specially the two last days of the learning phase. Thus, this result suggests that in aged mice, the ability to search the hidden platform was preserved but slowed by aging. Moreover, the 14 weeks supplementation with polyphenols can prevent this spatial learning alteration. Indeed, we have observed that aged mice fed the polyphenol-rich diet performed as well as adult control mice without any observable alteration. Contrary to what we might expect, aged mice did not present any deficit in spatial memory evaluated 48h after the last day of learning, suggesting that age-related spatial memory deficit cannot be brought in evidence in these conditions. It is not the first study to have shown that aged mice could present learning deficits without memory deficits (van Praag et al., 2005). Thus, using this paradigm, it was not possible for us to evidence any impact of polyphenols on the age-related spatial memory deficit. It would be interesting to later test the memory of aged mice, more than 48h after the learning, in order to evaluate spatial memory deficit. Furthermore, these observations may be dissociated from a potential anxiety effect since mice, adult as well as aged, did not display anxious behavior in the elevated-plus maze (**Figure S3**).

To determine, how the polyphenol-rich extract could impact behavioral responses at the neurobiological level, and knowing the relationship between hippocampal memory and the neuronal plasticity, we have evaluated neurogenesis in the dentate gyrus of mice hippocampus. As previously described, we observed an age-related decrease in the number of DCX-IR cells in the dentate gyrus (McDonald and Wojtowicz, 2005), indicating that age strongly impacts the number new neurons (Abrous et al., 2005; Klempin and Kempermann, 2007). Indeed, studies have revealed that there is no effect of age on the rate of survival of newborn progeny (McDonald and Wojtowicz, 2005; Rao et al., 2005). However, the reduction of DCX-IR cells could be due to impaired maturation (Rao et al., 2005) and/or to a slowed down capacity to migrate from the subgranular zone to the granular cell layer (Heine et al., 2004). Furthermore, a decrease in the differentiation into neuronal phenotypes, in favor of glial phenotypes, could also explain the decrease in DCX-IR cells with aging (McDonald and Wojtowicz, 2005). Interestingly, we observed that polyphenol-rich diet induce an increase in the proportion of DCX-IR cells with prolongations in aged mice. This observation may reflect a better survival of newly generated immature neurons and/or a better growth and differentiation. To go further, it would be interesting to specifically quantified the survival of newborn neurons in aged mice fed the polyphenols diet. The increased proportion of newly generated neurons exhibiting dendrite prolongations induced by polyphenols may be linked to the improving behavioral effect we observed on hippocampal-dependent learning and memory. Indeed, hippocampal neurogenesis has been directly link to cognition (Zhao et al., 2008; Stangl and Thuret, 2009). Moreover, DCX-expressing neurons are required for successful acquisition of spatial learning, but seems to be not necessary or the retrieval of

stored long-term memories, and the repopulation of the granule cell layer by newly generated immature neurons is necessary to rescue learning deficits (Vukovic et al., 2013). Flavanol supplementation has already been shown to improve spatial memory and to lead to increased angiogenesis and neuronal spine density but not newborn cell survival, in the dentate gyrus of the hippocampus (van Praag et al., 2007). More recently, Harada et al. have observed an enhancement of angiogenesis and neurogenesis in the dentate gyrus of mice hippocampus with a resveratrol supplementation (Harada et al., 2011).

Some polyphenols are also able to modulate cellular and molecular process involved in learning and memory (Williams and Grayer, 2004; Schroeter et al., 2007; Spencer, 2007; Vauzour et al., 2007; Rendeiro et al., 2009). In particular, they modulate the expression of neurotrophins in the hippocampus such as BDNF or NGF (Williams et al., 2008; Li et al., 2009a; Li et al., 2009b; De Nicolo et al., 2013; Rendeiro et al., 2013a; Rendeiro et al., 2013b). These neurotrophic factors have been shown to be involved in modulation of cerebral plasticity, since they are implicated in neuronal survival, outgrowth and differentiation (Finkbeiner et al., 1997; Finkbeiner, 2000; Schinder and Poo, 2000; Conkright et al., 2003; Pruunsild et al., 2011), and NGF has also a role in modulation of synaptic plasticity and in process of LTP in hippocampus (Maguire et al., 1999; Hennigan et al., 2009). Moreover, increased NGF expression has been associated with an improvement of memory performances particularly in aged animal (Fischer et al., 1991; Woolf et al., 2001). In the present study, polyphenols consumption induced an increase of hippocampal NGF expression, both in adult or aged animals, even if previous decreased expression, in particular in aged animals, was not observable. This observation is coherent with previous data showing that signaling pathways involved in learning and memory can be modulated by polyphenols. Such an increased expression of NGF in response to polyphenols consumption has already been described in mice brain but with other source and kind of polyphenols (from olive pulp *Olea europaea L.*)(De Nicolo et al., 2013). Thus, the polyphenol effect we observed on hippocampal neurogenesis could be the result of an up-regulation of hippocampal NGF expression which could thus contribute to maintain hippocampal-dependent learning and memory during aging. In our conditions, we have not observed any modification of hippocampal BDNF mRNA expression neither under the influence of age nor under that of polyphenols. Up- or down-regulation of BDNF during aging seems to be specific of the species studied and dependent of the brain region. Thus, whereas an increase of BDNF expression has been described in the murine hippocampus during normal aging, but not when mice display age-related pathological changes (Kato-Semba et al., 1998), hippocampal BDNF levels were significantly reduced in aged rats compared to young adults (Karege et al., 2002). In order to explain the discrepancy between our results on the absence of effect of polyphenol consumption on BDNF expression and others that demonstrate a positive effect, another point has to be considered. Indeed, in the present study, we have measured BDNF expression after two weeks of behavioral tasks in which animals have physical activity. But, physical activity can modulate hippocampal BDNF expression (Gomez-Pinilla and Hillman, 2013) and it is possible to suppose that in our study the physical activity practice in behavioral tasks might compensate aging effect and thus might mask any changes of BDNF expression already described in aged animals with or without polyphenol consumption (Calabrese et al., 2013; Rendeiro et al., 2013b).

Interestingly, all along this study we have observed that mice fed the Neurophenol enriched diet displayed a better survival than control mice. Indeed, during the experiment performed with three different cohorts of mice (i.e. 27 animals per groups), we have observed that 19% of the control aged mice progressively died all along the 14 weeks whereas all the polyphenol supplemented mice survived. This observation is consistent with other results showing that resveratrol increases lifespan (Agarwal and Baur, 2011). It has been suggested

that this effect could be mediated by a modulation of the sirtuins by resveratrol and by a decrease of the oxidative stress (Baur and Sinclair, 2006; Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2014). It remains necessary to further explore this beneficial effect on lifespan of a daily consumption of a mix of blueberry and grape extracts, in order to better understand the mechanisms underlying healthy aging.

Knowing whether polyphenol and their metabolic derivatives are able to access the central nervous system is an important question to elucidate whether they have direct effects in brain. After 14 weeks of Polyphenol-rich diet consumption, some flavanols (catechin, epicatechin) and their metabolites (methyl-catechin-glucuronid, catechin-glucuronide) are found in plasma of mice (**Figure S5A,B**) and they have reached the brain (**Figure S5C**). Interestingly, proanthocyanidins dimers are also found in the brain. These results suggest that polyphenols could act directly in the brain to exert their neuroprotective effects. Some studies have also reported that polyphenols are found in the brain tissue after oral ingestion. Some flavanols, as catechin and epicatechin metabolites, have been found in the rat brain (Abd El Mohsen et al., 2002; van Praag et al., 2007; Williams et al., 2008; Ferruzzi et al., 2009; Prasain et al., 2009). Others, among which some dietary anthocyanins, cyanidin-3-rutinoside and pelargonidin-3-glucoside, have been reported to be able to penetrate the blood brain barrier in relevant in vitro and in situ models (Youdim et al., 2004). Moreover, anthocyanins have also been detected in different area of the brain of rats (Andres-Lacueva et al., 2005; Passamonti et al., 2005) and pigs fed with blueberry (Kalt et al., 2008; Milbury and Kalt, 2010). Several reports have confirmed that orally administered resveratrol is absorbed and cross the blood–brain barrier and incorporate into the brain (Asensi et al., 2002; Wang et al., 2002; Abd El-Mohsen et al., 2006; Juan et al., 2010). The possible existence of specific polyphenol binding sites at the cellular plasma membrane level in rat brain has been suggested (Han et al., 2006). The activation by polyphenols and resveratrol analogs of such common "receptors"- binding sites particularly enriched at the plasma membrane level in rat brain- might mediate their neuroprotective action.

## **Conclusion**

It is important today to develop new strategies aiming to improve the quality of life of the elderly and to alleviate the social and economic burdens due to dependency associated to the prolongation of life expectancy. The well-being of aged people is closely link to good memory performances and a proper brain functioning which are very often strongly altered by aging. An optimized preventive nutrition could allow avoiding or delaying evolution towards dementia and thus promote the maintenance of a satisfactory cognitive state in elderly subjects. Several data bring interest to polyphenols for their capacity to impact on learning and memory. Our results show that the consumption of concentrated polyphenols extracted from grape and blueberry, potentially by a direct effect of metabolites on the brain, can modulate molecular parameters, neuronal plasticity and memory performances and suggest that they must be effective to maintain cognitive functions during aging. Moreover we have shown that this extract is also efficient to prolong lifespan. Together the data obtained in the present study might contribute to the definition of nutritional recommendations concerning polyphenols and targeting a healthy aging. The promnesic effect of the Neurophenol mix is currently evaluated in a clinical trial in human.

## Acknowledgments

This work has been supported by the Conseil Régional d'Aquitaine, the FUI. The authors would like to thank Mathieu Cadet and Philippe Birac for animal care. We are also grateful to Damien Bonhomme, Serge Alfos and Katia Touyarot for their technical contribution and the Neurophenols consortium.

## Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## References

- Abd El-Mohsen, M., Bayele, H., Kuhnle, G., Gibson, G., Debnam, E., Kaila Srari, S., Rice-Evans, C., and Spencer, J.P. (2006). Distribution of [3H]trans-resveratrol in rat tissues following oral administration. *Br J Nutr* 96, 62-70.
- Abd El Mohsen, M.M., Kuhnle, G., Rechner, A.R., Schroeter, H., Rose, S., Jenner, P., and Rice-Evans, C.A. (2002). Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radic Biol Med* 33, 1693-1702.
- Abraham, J., and Johnson, R.W. (2009). Consuming a diet supplemented with resveratrol reduced infection-related neuroinflammation and deficits in working memory in aged mice. *Rejuvenation Res* 12, 445-453. doi: 10.1089/rej.2009.0888.
- Abrous, D.N., Koehl, M., and Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85, 523-569. doi: 10.1152/physrev.00055.2003.
- Agarwal, B., and Baur, J.A. (2011). Resveratrol and life extension. *Ann N Y Acad Sci* 1215, 138-143. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05850.x.
- Allen, S.J., and Dawbarn, D. (2006). Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin Sci (Lond)* 110, 175-191. doi: 10.1042/CS20050161.
- An, L., Zhang, Y.Z., Yu, N.J., Liu, X.M., Zhao, N., Yuan, L., Chen, H.X., and Li, Y.F. (2008). The total flavonoids extracted from Xiaobuxin-Tang up-regulate the decreased hippocampal neurogenesis and neurotrophic molecules expression in chronically stressed rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32, 1484-1490. doi: 10.1016/j.pnpbp.2008.05.005.
- Andres-Lacueva, C., Shukitt-Hale, B., Galli, R.L., Jauregui, O., Lamuela-Raventos, R.M., and Joseph, J.A. (2005). Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr Neurosci* 8, 111-120.
- Asensi, M., Medina, I., Ortega, A., Carretero, J., Bano, M.C., Obrador, E., and Estrela, J.M. (2002). Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic Biol Med* 33, 387-398.
- Barnabe-Heider, F., and Miller, F.D. (2003). Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci* 23, 5149-5160.
- Baur, J.A., and Sinclair, D.A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5, 493-506. doi: 10.1038/nrd2060.
- Bevins, R.A., and Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* 1, 1306-1311. doi: 10.1038/nprot.2006.205.
- Bramham, C.R., and Messaoudi, E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 76, 99-125. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.06.003.



- Bramham, C.R., and Wells, D.G. (2007). Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* 8, 776-789. doi: 10.1038/nrn2150.
- Buffalo, E.A., Bellgowan, P.S., and Martin, A. (2006). Distinct roles for medial temporal lobe structures in memory for objects and their locations. *Learn Mem* 13, 638-643. doi: 10.1101/lm.251906.
- Calabrese, F., Guidotti, G., Racagni, G., and Riva, M.A. (2013). Reduced neuroplasticity in aged rats: a role for the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor. *Neurobiol Aging* 34, 2768-2776. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.014.
- Calabrese, F., Molteni, R., Racagni, G., and Riva, M.A. (2009). Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1, S208-216. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.05.014.
- Carew, T.J. (1996). Molecular enhancement of memory formation. *Neuron* 16, 5-8.
- Carey, A.N., Gomes, S.M., and Shukitt-Hale, B. (2014). Blueberry Supplementation Improves Memory in Middle-Aged Mice Fed a High-Fat Diet. *J Agric Food Chem*. doi: 10.1021/jf404565s.
- Chao, M.V., Rajagopal, R., and Lee, F.S. (2006). Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond)* 110, 167-173. doi: 10.1042/CS20050163.
- Clark, R.E., Zola, S.M., and Squire, L.R. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci* 20, 8853-8860.
- Conkright, M.D., Guzman, E., Flechner, L., Su, A.I., Hogenesch, J.B., and Montminy, M. (2003). Genome-wide analysis of CREB target genes reveals a core promoter requirement for cAMP responsiveness. *Mol Cell* 11, 1101-1108.
- D'hooge, R., and 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.
- Dal-Pan, A., Pifferi, F., Marchal, J., Picq, J.L., and Aujard, F. (2011a). Cognitive performances are selectively enhanced during chronic caloric restriction or resveratrol supplementation in a primate. *PLoS One* 6, e16581. doi: 10.1371/journal.pone.0016581.
- Dal-Pan, A., Terrien, J., Pifferi, F., Botalla, R., Hardy, I., Marchal, J., Zahariev, A., Chery, I., Zizzari, P., Perret, M., Picq, J.L., Epelbaum, J., Blanc, S., and Aujard, F. (2011b). Caloric restriction or resveratrol supplementation and ageing in a non-human primate: first-year outcome of the RESTRIKAL study in *Microcebus murinus*. *Age (Dordr)* 33, 15-31. doi: 10.1007/s11357-010-9156-6.
- De Fiebre, N.C., Sumien, N., Forster, M.J., and De Fiebre, C.M. (2006). Spatial learning and psychomotor performance of C57BL/6 mice: age sensitivity and reliability of individual differences. *Age (Dordr)* 28, 235-253. doi: 10.1007/s11357-006-9027-3.
- De Hoz, L., Moser, E.I., and Morris, R.G. (2005). Spatial learning with unilateral and bilateral hippocampal networks. *Eur J Neurosci* 22, 745-754. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04255.x.
- De Nicolo, S., Tarani, L., Ceccanti, M., Maldini, M., Natella, F., Vania, A., Chaldakov, G.N., and Fiore, M. (2013). Effects of olive polyphenols administration on nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the mouse brain. *Nutrition* 29, 681-687. doi: 10.1016/j.nut.2012.11.007.
- Deng, W., Aimone, J.B., and Gage, F.H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11, 339-350. doi: 10.1038/nrn2822.
- Dere, E., Huston, J.P., and De Souza Silva, M.A. (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 31, 673-704. doi: 10.1016/j.neubiorev.2007.01.005.
- Dias, G.P., Cavegn, N., Nix, A., Do Nascimento Bevilaqua, M.C., Stangl, D., Zainuddin, M.S., Nardi, A.E., Gardino, P.F., and Thuret, S. (2012). The role of dietary polyphenols on adult hippocampal neurogenesis: molecular mechanisms and behavioural effects on depression and anxiety. *Oxid Med Cell Longev* 2012, 541971. doi: 10.1155/2012/541971.
- Dix, S.L., and Aggleton, J.P. (1999). Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav Brain Res* 99, 191-200.
- Drapeau, E., and Nora Abrous, D. (2008). Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell* 7, 569-589. doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00369.x.

- Ennaceur, A., and Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31, 47-59.
- Fahlstrom, A., Yu, Q., and Ulfhake, B. (2011). Behavioral changes in aging female C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging* 32, 1868-1880. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.11.003.
- Ferruzzi, M.G., Lobo, J.K., Janle, E.M., Cooper, B., Simon, J.E., Wu, Q.L., Welch, C., Ho, L., Weaver, C., and Pasinetti, G.M. (2009). Bioavailability of gallic acid and catechins from grape seed polyphenol extract is improved by repeated dosing in rats: implications for treatment in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 18, 113-124. doi: 10.3233/JAD-2009-1135.
- Finkbeiner, S. (2000). CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron* 25, 11-14.
- Finkbeiner, S., Tavazoie, S.F., Maloratsky, A., Jacobs, K.M., Harris, K.M., and Greenberg, M.E. (1997). CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19, 1031-1047.
- Fischer, W., Bjorklund, A., Chen, K., and Gage, F.H. (1991). NGF improves spatial memory in aged rodents as a function of age. *J Neurosci* 11, 1889-1906.
- Frick, K.M., Baxter, M.G., Markowska, A.L., Olton, D.S., and Price, D.L. (1995). Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze. *Neurobiol Aging* 16, 149-160.
- Gazova, I., Laczo, J., Rubinova, E., Mokrisova, I., Hyncicova, E., Andel, R., Vyhnaek, M., Sheardova, K., Coulson, E.J., and Hort, J. (2013). Spatial navigation in young versus older adults. *Front Aging Neurosci* 5, 94. doi: 10.3389/fnagi.2013.00094.
- Gomez-Pinilla, F. (2008). Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nat Rev Neurosci* 9, 568-578. doi: 10.1038/nrn2421.
- Gomez-Pinilla, F., and Hillman, C. (2013). The influence of exercise on cognitive abilities. *Compr Physiol* 3, 403-428. doi: 10.1002/cphy.c110063.
- Hammond, R.S., Tull, L.E., and Stackman, R.W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 82, 26-34. doi: 10.1016/j.nlm.2004.03.005.
- Han, Y.S., Bastianetto, S., Dumont, Y., and Quirion, R. (2006). Specific plasma membrane binding sites for polyphenols, including resveratrol, in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 238-245. doi: 10.1124/jpet.106.102319.
- Harada, N., Zhao, J., Kurihara, H., Nakagata, N., and Okajima, K. (2011). Resveratrol improves cognitive function in mice by increasing production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. *J Nutr Biochem* 22, 1150-1159. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.09.016.
- Heine, V.M., Maslam, S., Joels, M., and Lucassen, P.J. (2004). Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation. *Neurobiol Aging* 25, 361-375. doi: 10.1016/S0197-4580(03)00090-3.
- Hennigan, A., Callaghan, C.K., Kealy, J., Rouine, J., and Kelly, A.M. (2009). Deficits in LTP and recognition memory in the genetically hypertensive rat are associated with decreased expression of neurotrophic factors and their receptors in the dentate gyrus. *Behav Brain Res* 197, 371-377. doi: 10.1016/j.bbr.2008.09.037.
- Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., and Casadesus, G. (2005). Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am J Clin Nutr* 81, 313S-316S.
- Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N.A., Bielinski, D., Martin, A., McEwen, J.J., and Bickford, P.C. (1999). Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci* 19, 8114-8121.
- Juan, M.E., Maijo, M., and Planas, J.M. (2010). Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 51, 391-398. doi: 10.1016/j.jpba.2009.03.026.
- Kalt, W., Blumberg, J.B., McDonald, J.E., Vinqvist-Tymchuk, M.R., Fillmore, S.A., Graf, B.A., O'leary, J.M., and Milbury, P.E. (2008). Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *J Agric Food Chem* 56, 705-712. doi: 10.1021/jf071998l.
- Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038. doi: 10.1126/science.1067020.

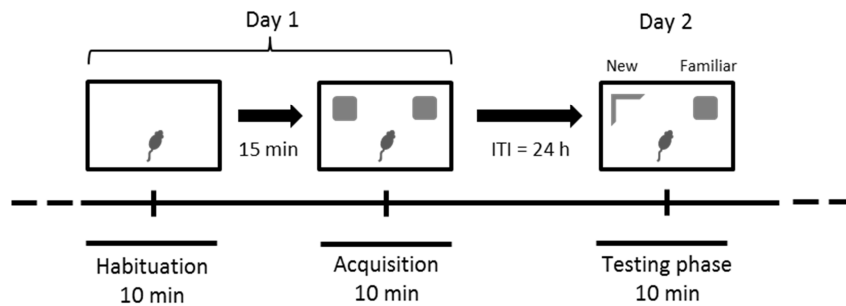
- Karege, F., Schwald, M., and Cisse, M. (2002). Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett* 328, 261-264.
- Katoh-Semba, R., Semba, R., Takeuchi, I.K., and Kato, K. (1998). Age-related changes in levels of brain-derived neurotrophic factor in selected brain regions of rats, normal mice and senescence-accelerated mice: a comparison to those of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Neurosci Res* 31, 227-234.
- Kelleher, R.J., 3rd, Govindarajan, A., and Tonegawa, S. (2004). Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 44, 59-73. doi: 10.1016/j.neuron.2004.09.013.
- Klempin, F., and Kempermann, G. (2007). Adult hippocampal neurogenesis and aging. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257, 271-280. doi: 10.1007/s00406-007-0731-5.
- Krikorian, R., Boespflug, E.L., Fleck, D.E., Stein, A.L., Wightman, J.D., Shidler, M.D., and Sadat-Hossieny, S. (2012). Concord grape juice supplementation and neurocognitive function in human aging. *J Agric Food Chem* 60, 5736-5742. doi: 10.1021/jf300277g.
- Krikorian, R., Nash, T.A., Shidler, M.D., Shukitt-Hale, B., and Joseph, J.A. (2010a). Concord grape juice supplementation improves memory function in older adults with mild cognitive impairment. *Br J Nutr* 103, 730-734. doi: 10.1017/S0007114509992364.
- Krikorian, R., Shidler, M.D., Nash, T.A., Kalt, W., Vinqvist-Tymchuk, M.R., Shukitt-Hale, B., and Joseph, J.A. (2010b). Blueberry supplementation improves memory in older adults. *J Agric Food Chem* 58, 3996-4000. doi: 10.1021/jf9029332.
- Lai, Z.C., Moss, M.B., Killiany, R.J., Rosene, D.L., and Herndon, J.G. (1995). Executive system dysfunction in the aged monkey: spatial and object reversal learning. *Neurobiol Aging* 16, 947-954.
- Lemaire, V., Lamarque, S., Le Moal, M., Piazza, P.V., and Abrous, D.N. (2006). Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 59, 786-792. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.11.009.
- Li, Q., Zhao, H.F., Zhang, Z.F., Liu, Z.G., Pei, X.R., Wang, J.B., Cai, M.Y., and Li, Y. (2009a). Long-term administration of green tea catechins prevents age-related spatial learning and memory decline in C57BL/6 J mice by regulating hippocampal cyclic amp-response element binding protein signaling cascade. *Neuroscience* 159, 1208-1215. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.02.008.
- Li, Q., Zhao, H.F., Zhang, Z.F., Liu, Z.G., Pei, X.R., Wang, J.B., and Li, Y. (2009b). Long-term green tea catechin administration prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing Abeta1-42 oligomers and upregulating synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus. *Neuroscience* 163, 741-749. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.07.014.
- Lindner, M.D. (1997). Reliability, distribution, and validity of age-related cognitive deficits in the Morris water maze. *Neurobiol Learn Mem* 68, 203-220. doi: 10.1006/nlme.1997.3782.
- Maguire, C., Casey, M., Kelly, A., Mullany, P.M., and Lynch, M.A. (1999). Activation of tyrosine receptor kinase plays a role in expression of long-term potentiation in the rat dentate gyrus. *Hippocampus* 9, 519-526. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:5<519::AID-HIPO5>3.0.CO;2-Y.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727-747.
- Mandel, S., and Youdim, M.B. (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med* 37, 304-317. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.012.
- Martin, K.C., Barad, M., and Kandel, E.R. (2000). Local protein synthesis and its role in synapse-specific plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 10, 587-592.
- Mcdonald, H.Y., and Wojtowicz, J.M. (2005). Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci Lett* 385, 70-75. doi: 10.1016/j.neulet.2005.05.022.
- Michalski, B., and Fahnstock, M. (2003). Pro-brain-derived neurotrophic factor is decreased in parietal cortex in Alzheimer's disease. *Molecular Brain Research* 111, 148-154. doi: 10.1016/s0169-328x(03)00003-2.

- Milbury, P.E., and Kalt, W. (2010). Xenobiotic metabolism and berry flavonoid transport across the blood-brain barrier. *J Agric Food Chem* 58, 3950-3956. doi: 10.1021/jf903529m.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11, 47-60.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., and O'keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681-683.
- Moser, M.B., Moser, E.I., Forrest, E., Andersen, P., and Morris, R.G. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9697-9701.
- Mumby, D.G. (2001). Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behav Brain Res* 127, 159-181.
- Mumby, D.G., Gaskin, S., Glenn, M.J., Schramek, T.E., and Lehmann, H. (2002). Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learn Mem* 9, 49-57. doi: 10.1101/lm.41302.
- Murphy, T., Dias, G.P., and Thuret, S. (2014). Effects of diet on brain plasticity in animal and human studies: mind the gap. *Neural Plast* 2014, 563160. doi: 10.1155/2014/563160.
- Nguyen, N., Lee, S.B., Lee, Y.S., Lee, K.H., and Ahn, J.Y. (2009). Neuroprotection by NGF and BDNF against neurotoxin-exerted apoptotic death in neural stem cells are mediated through Trk receptors, activating PI3-kinase and MAPK pathways. *Neurochem Res* 34, 942-951. doi: 10.1007/s11064-008-9848-9.
- O'keefe, J., Nadel, L., Keightley, S., and Kill, D. (1975). Fornix lesions selectively abolish place learning in the rat. *Exp Neurol* 48, 152-166.
- Papandreou, M.A., Dimakopoulou, A., Linardaki, Z.I., Cordopatis, P., Klimis-Zacas, D., Margarity, M., and Lamari, F.N. (2009). Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. *Behav Brain Res* 198, 352-358. doi: 10.1016/j.bbr.2008.11.013.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., and Mattivi, F. (2005). Fast access of some grape pigments to the brain. *J Agric Food Chem* 53, 7029-7034. doi: 10.1021/jf050565k.
- Peng, S., Wu, J., Mufson, E.J., and Fahnstock, M. (2005). Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 93, 1412-1421. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03135.x.
- Pham, T.M., Winblad, B., Granholm, A.C., and Mohammed, A.H. (2002). Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73, 167-175.
- Phillips, H.S., Hains, J.M., Armanini, M., Laramée, G.R., Johnson, S.A., and Winslow, J.W. (1991). BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 7, 695-702.
- Poo, M.M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2, 24-32. doi: 10.1038/35049004.
- Prasain, J.K., Peng, N., Dai, Y., Moore, R., Arabshahi, A., Wilson, L., Barnes, S., Michael Wyss, J., Kim, H., and Watts, R.L. (2009). Liquid chromatography tandem mass spectrometry identification of proanthocyanidins in rat plasma after oral administration of grape seed extract. *Phytomedicine* 16, 233-243. doi: 10.1016/j.phymed.2008.08.006.
- Pruunsild, P., Sepp, M., Orav, E., Koppel, I., and Timmusk, T. (2011). Identification of cis-elements and transcription factors regulating neuronal activity-dependent transcription of human BDNF gene. *J Neurosci* 31, 3295-3308. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4540-10.2011.
- Queen, B.L., and Tollefsbol, T.O. (2010). Polyphenols and aging. *Curr Aging Sci* 3, 34-42.
- Rao, M.S., Hattiangady, B., Abdel-Rahman, A., Stanley, D.P., and Shetty, A.K. (2005). Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur J Neurosci* 21, 464-476. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.03853.x.
- Rapp, P.R., Kansky, M.T., and Roberts, J.A. (1997). Impaired spatial information processing in aged monkeys with preserved recognition memory. *Neuroreport* 8, 1923-1928.
- Rendeiro, C., Foley, A., Lau, V.C., Ring, R., Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Williams, C.M., Regan, C., and Spencer, J.P. (2013a). A role for hippocampal PSA-NCAM and NMDA-NR2B

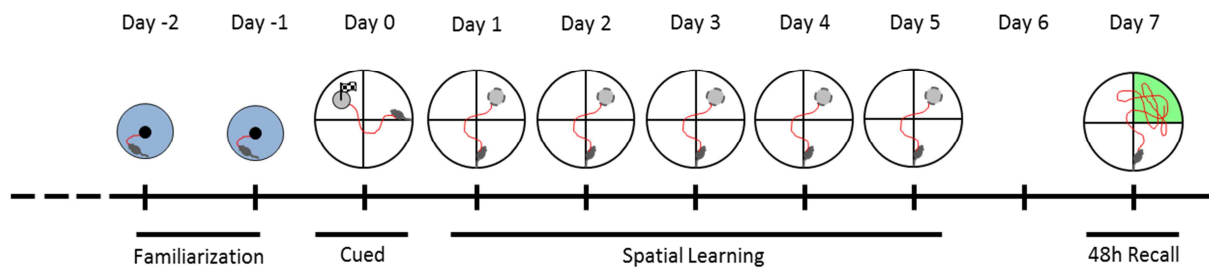
- receptor function in flavonoid-induced spatial memory improvements in young rats. *Neuropharmacology* 79C, 335-344. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.003.
- Rendeiro, C., Spencer, J.P., Vauzour, D., Butler, L.T., Ellis, J.A., and Williams, C.M. (2009). The impact of flavonoids on spatial memory in rodents: from behaviour to underlying hippocampal mechanisms. *Genes Nutr* 4, 251-270. doi: 10.1007/s12263-009-0137-2.
- Rendeiro, C., Vauzour, D., Kean, R.J., Butler, L.T., Rattray, M., Spencer, J.P., and Williams, C.M. (2012). Blueberry supplementation induces spatial memory improvements and region-specific regulation of hippocampal BDNF mRNA expression in young rats. *Psychopharmacology (Berl)* 223, 319-330. doi: 10.1007/s00213-012-2719-8.
- Rendeiro, C., Vauzour, D., Rattray, M., Waffo-Teguo, P., Merillon, J.M., Butler, L.T., Williams, C.M., and Spencer, J.P. (2013b). Dietary levels of pure flavonoids improve spatial memory performance and increase hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *PLoS One* 8, e63535. doi: 10.1371/journal.pone.0063535.
- Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R., Myskiw, J.C., Medina, J.H., Izquierdo, I., and Cammarota, M. (2007). On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 14, 36-46. doi: 10.1101/lm.422607.
- Sadowska-Bartosz, I., and Bartosz, G. (2014). Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity. *Biomed Res Int* 2014, 404680. doi: 10.1155/2014/404680.
- Schinder, A.F., and Poo, M. (2000). The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 23, 639-645.
- Schroeter, H., Bahia, P., Spencer, J.P., Sheppard, O., Rattray, M., Cadenas, E., Rice-Evans, C., and Williams, R.J. (2007). (-)Epicatechin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and up-regulates GluR2 in cortical neurons. *J Neurochem* 101, 1596-1606. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04434.x.
- Shan, Q., Lu, J., Zheng, Y., Li, J., Zhou, Z., Hu, B., Zhang, Z., Fan, S., Mao, Z., Wang, Y.J., and Ma, D. (2009). Purple sweet potato color ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage and inflammation in aging mouse brain induced by d-galactose. *J Biomed Biotechnol* 2009, 564737. doi: 10.1155/2009/564737.
- Shukitt-Hale, B., Lau, F.C., and Joseph, J.A. (2008). Berry fruit supplementation and the aging brain. *J Agric Food Chem* 56, 636-641. doi: 10.1021/jf072505f.
- Sossin, W.S. (2008). Defining memories by their distinct molecular traces. *Trends Neurosci* 31, 170-175. doi: 10.1016/j.tins.2008.01.001.
- Spencer, J.P. (2007). The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways. *Genes Nutr* 2, 257-273. doi: 10.1007/s12263-007-0056-z.
- Spencer, J.P. (2009). Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes Nutr* 4, 243-250. doi: 10.1007/s12263-009-0136-3.
- Squire, L.R., Wixted, J.T., and Clark, R.E. (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci* 8, 872-883. doi: 10.1038/nrn2154.
- Stangl, D., and Thuret, S. (2009). Impact of diet on adult hippocampal neurogenesis. *Genes Nutr* 4, 271-282. doi: 10.1007/s12263-009-0134-5.
- Tan, L., Yang, H.P., Pang, W., Lu, H., Hu, Y.D., Li, J., Lu, S.J., Zhang, W.Q., and Jiang, Y.G. (2014). Cyanidin-3-O-galactoside and Blueberry Extracts Supplementation Improves Spatial Memory and Regulates Hippocampal ERK Expression in Senescence-accelerated Mice. *Biomed Environ Sci* 27, 186-196. doi: 10.3967/bes2014.007.
- Teng, E., and Squire, L.R. (1999). Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature* 400, 675-677. doi: 10.1038/23276.
- Uttl, B., and Graf, P. (1993). Episodic spatial memory in adulthood. *Psychol Aging* 8, 257-273.
- Van Praag, H., Lucero, M.J., Yeo, G.W., Stecker, K., Heivand, N., Zhao, C., Yip, E., Afanador, M., Schroeter, H., Hammerstone, J., and Gage, F.H. (2007). Plant-derived flavanol (-)epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. *J Neurosci* 27, 5869-5878. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0914-07.2007.
- Van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., and Gage, F.H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25, 8680-8685. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1731-05.2005.

- Vargha-Khadem, F., Gadian, D.G., Watkins, K.E., Connelly, A., Van Paesschen, W., and Mishkin, M. (1997). Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Science* 277, 376-380.
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Corona, G., Pollard, S.E., Tzounis, X., and Spencer, J.P. (2007). Champagne wine polyphenols protect primary cortical neurons against peroxynitrite-induced injury. *J Agric Food Chem* 55, 2854-2860. doi: 10.1021/jf063304z.
- Vukovic, J., Borlikova, G.G., Ruitenbergh, M.J., Robinson, G.J., Sullivan, R.K., Walker, T.L., and Bartlett, P.F. (2013). Immature doublecortin-positive hippocampal neurons are important for learning but not for remembering. *J Neurosci* 33, 6603-6613. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3064-12.2013.
- Wang, Q., Xu, J., Rottinghaus, G.E., Simonyi, A., Lubahn, D., Sun, G.Y., and Sun, A.Y. (2002). Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res* 958, 439-447.
- Wilkniss, S.M., Jones, M.G., Korol, D.L., Gold, P.E., and Manning, C.A. (1997). Age-related differences in an ecologically based study of route learning. *Psychol Aging* 12, 372-375.
- Williams, C.A., and Grayer, R.J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep* 21, 539-573. doi: 10.1039/b311404j.
- Williams, C.M., El Mohsen, M.A., Vauzour, D., Rendeiro, C., Butler, L.T., Ellis, J.A., Whiteman, M., and Spencer, J.P. (2008). Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free Radic Biol Med* 45, 295-305. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.008.
- Williams, R.J., Spencer, J.P., and Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 36, 838-849. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001.
- Wolff, M., Savova, M., Malleret, G., Segu, L., and Buhot, M.C. (2002). Differential learning abilities of 129T2/Sv and C57BL/6J mice as assessed in three water maze protocols. *Behav Brain Res* 136, 463-474.
- Woolf, N.J., Milov, A.M., Schweitzer, E.S., and Roghani, A. (2001). Elevation of nerve growth factor and antisense knockdown of TrkA receptor during contextual memory consolidation. *J Neurosci* 21, 1047-1055.
- Yokozawa, T. (2011). Anti-aging effects of oligomeric proanthocyanidins isolated from persimmon fruits. *Drug Discoveries & Therapeutics*. doi: 10.5582/ddt.2011.v5.3.109.
- Youdim, K.A., Qaiser, M.Z., Begley, D.J., Rice-Evans, C.A., and Abbott, N.J. (2004). Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med* 36, 592-604. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.023.
- Yu, S.Y., Zhang, M., Luo, J., Zhang, L., Shao, Y., and Li, G. (2013). Curcumin ameliorates memory deficits via neuronal nitric oxide synthase in aged mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 45, 47-53. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.05.001.
- Zhao, C., Deng, W., and Gage, F.H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.033.

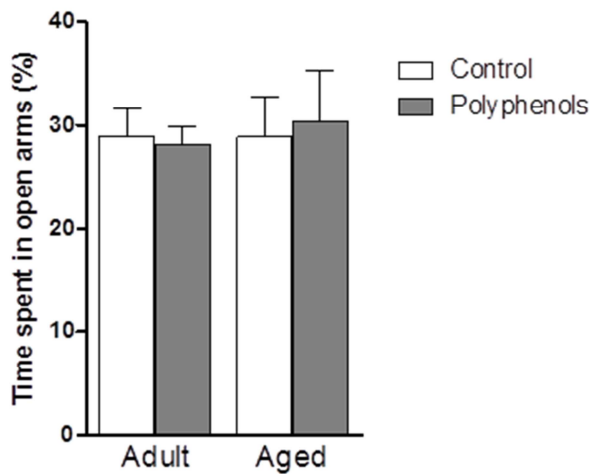
Supplementary data



**Figure S1 | Novel object recognition procedure.** During the first session, mice were habituated to the open field in the absence of objects and allowed to explore the environment for 10 min. Mice were then return to their home cage for 15 min before the second session. During this second session, mice were placed in the same box with two identical objects. Mice were allowed to freely explore the environment and the objects for 10 min. After 24h, mice were placed back in the open field for the testing phase. This time, one of the objects was replaced by a novel one. Mice were allowed to explore for 15 min.

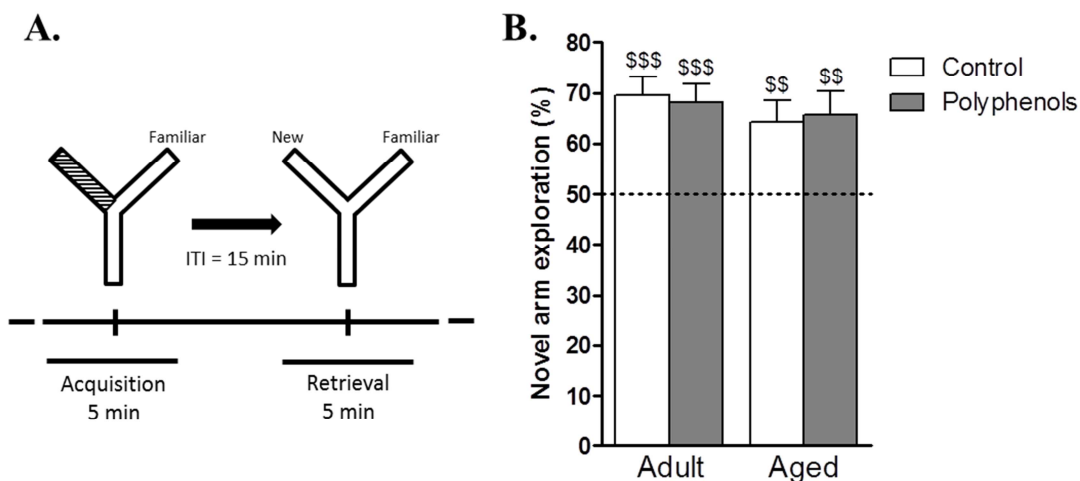


**Figure S2 | Morris water Maze procedure.** A 2-day familiarization period was performed before the one day cued learning. Spatial learning has then been evaluated for 5 days.48h after the last learning trial, a probe test was performed in order to evaluate spatial memory.



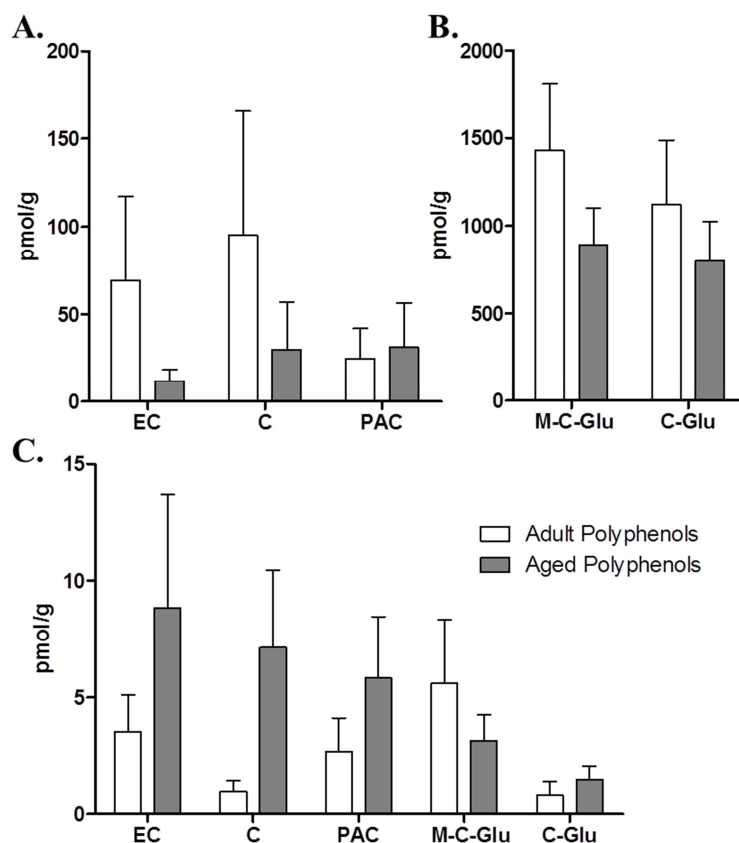
**Figure S3 | Effects of Polyphenols-rich diet on anxiety-like behavior.** The influence of aging and polyphenols supplementation on anxiety-like behavior was evaluated in the elevated plus-maze. The elevated plus-maze apparatus consisted of two opposite open arms (40×10 cm) and two opposite enclosed arms (40×10 cm) emanating from a common central platform (10×10 cm) to form a plus shape. The apparatus was elevated 80cm above the floor. A lowlight intensity was used for the enclosed arms (30 lux) versus a highlight intensity for the open arms (100 lux). Each mouse was placed on the central platform with his head facing an open arm. The anxiety-related behavior (percentage of time spent in open arms) as indexes of anxiety of all animals were recorded for a period of 5 min by a video-track system (Panlab SMART, Bioseb, France). Percentage of time spent in open

arms revealed that all groups spent the same time in open arms (age:  $F(1,72)=0.094$ , n.s., diet:  $F(1,72)=0.010$ , n.s., age x diet:  $F(1,72)=0.120$ , n.s.). Nor age or polyphenols-rich diet impact on anxiety-like behavior.



**Figure S4 | Effects of Polyphenols-rich diet on short-term memory.** (A) To evaluate short-term memory mice were tested in the Y-maze. The Y-maze apparatus, made up of three enclosed black arms (50 cm long, 10 cm wide, and 10 cm high) with extramaze visual cues around the maze, was used to assess hippocampal-dependent spatial recognition memory. The test consisted of two trials separated by an intertrial interval (ITI). In the first training (acquisition) trial, mice were placed at the end of a start arm and allowed to explore the maze for 5 min with one of the arms closed (novel arm). Mice were returned to their home cage until the second (retrieval) trial, during which they could explore freely all three arms of the maze. The time spent in each arm was measured and analyzed from video recordings using a computer tracking system (Panlab SMART, Bioseb, France). Percentage of time spent in the novel arm was calculated during the retrieval trial (time spent in novel arm / (time spent in novel arm + time spent in familiar arm)) with a chance percentage of 50%. A 15min ITI was chosen to evaluate short term memory. (B) Percentage of time spent in the novel arm was not significantly different between groups (age:  $F(1,73)=0.970$ , n.s., diet:  $F(1,73)=1.304E-4$ , n.s., age x diet:  $F(1,73)=0.131$ , n.s.). Moreover, the four groups spent preferentially more time in the novel arm (adult control:  $p<0.0001$ ; adult supplemented:  $p<0.0001$ ; aged control:  $p<0.01$ ; aged supplemented:  $p<0.01$ ). In this test, with a 15 min ITI, aged mice performed as well as adult mice and there is no effect of polyphenols-rich diet.





**Figure S5 | Bioavailability of some polyphenols from the extract.** It is very interesting to know what polyphenols can be available in the plasma and in which form but it is maybe more interesting to know if these polyphenols are found in the brain and if they can act directly at this level. We have focused our interest on flavanols because they are mainly present in our extract. As expected, some flavanols were found (A) at the plasma level as native form as epicatechin (EC), catechin (C) or proanthocyanidins B dimers (PAC), (B) or as metabolized form as methyl-catechin glucuronide (M-C-Glu) or catechin glucuronide (C-Glu). (C) Interestingly, we showed that all these forms can be found in the brain in lower quantity in both adult and aged mice with no significant differences between ages.





## **PARTIE II**



## **EFFET D'UNE SUPPLEMENTATION EN POLYPHENOLS SUR L'APPRENTISSAGE SPATIAL AU COURS DU VIEILLISSEMENT**

### **I. Introduction**

Les données bibliographiques ont déjà montré que des supplémentation en polyphénols pouvaient pallier au déclin mnésique lié au vieillissement et en particulier en jouant sur la plasticité hippocampique (Mandel and Youdim, 2004; Andres-Lacueva et al., 2005; Spencer, 2007; Shukitt-Hale et al., 2008; Spencer et al., 2009). Le premier objectif de cette étude a été de confirmer que l'extrait Neurophenol® pouvait permettre de réduire les altérations d'apprentissage et de mémoire lié à l'âge chez la souris âgée. Notre étude s'est ensuite intéressée à l'évolution de l'apprentissage en labyrinthe aquatique qui peut être influencée par des altérations au niveau hippocampique. Enfin, nous avons étudié l'expression hippocampique de certains gènes impliqués dans la plasticité cérébrale afin de déterminé les potentiels modes d'actions des polyphénols utilisés.

### **II. Méthodologie**

Nous avons étudié l'effet d'une supplémentation nutritionnelle en polyphénols de raisin et de bleuet (extrait Neurophenol®) de 8 semaines sur l'apprentissage et la mémoire spatiale de référence. Quatre groupes de souris ont été constitués. Des souris adultes et des souris âgées ont été nourries pendant 8 semaines avec un régime contrôle ou avec un régime enrichi en polyphénols. L'apprentissage et la mémoire spatiale ont été évalués en utilisant le labyrinthe aquatique de Morris. Les stratégies d'apprentissage au cours de ce test ont été analysées. L'expression hippocampique de gènes cibles a été quantifiée par RT-qPCR.

### **III. Principaux résultats**

Nous avons montré qu'une supplémentation de 8 semaines avec des polyphénols était capable de restaurer les capacités d'apprentissage altérées par l'âge. Pour la première fois, nous avons montré que les souris âgées utilisent quantitativement moins de stratégies spatiales que les souris adultes lors de l'apprentissage en piscine de Morris. De plus, la supplémentation en polyphénols permet d'augmenter l'utilisation de stratégies spatiales chez les souris adultes et âgées ce qui pourrait expliquer les meilleures performances d'apprentissage. Enfin, nos résultats montrent que la supplémentation de 8 semaines permet de rétablir les niveaux d'expression hippocampique de la CaMKII réduits chez les souris âgées et qui est impliquée dans les processus de plasticité. Nous montrons également que cette

supplémentation en polyphénols permet d'augmenter l'expression de la neurotrophine NGF impliquée dans la survie, la croissance et la différenciation neuronale.

#### **IV. Conclusion**

Ces résultats confortent l'efficacité de l'extrait Neurophenol® contre le déclin mnésique lié au vieillissement. Cette étude apporte également des données nouvelles sur le mode de fonctionnement des polyphénols de raisin et de bleuet en montrant que ceux-ci peuvent moduler l'expression de NGF chez les animaux adultes et âgés. Enfin, l'analyse des stratégies d'apprentissage permet d'observer des déficits hippocampiques au cours de l'apprentissage spatial chez les souris âgées et semble un bon moyen d'évaluer l'efficacité d'une intervention nutritionnelle sur les fonctions hippocampiques.

Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise dans **Frontiers in Behavioral Neuroscience**.

## **A polyphenol supplementation can prevent age-induced alterations in the adoption of spatial strategies**

BENSALEM J.<sup>1,2,3</sup>, GAUDOUT D.<sup>3</sup>, SERVANT L.<sup>1,2</sup>, LAYE S.<sup>1,2</sup>, PALLET V.<sup>1,2\*</sup>, LAFENETRE P.<sup>1,2\*</sup>, for the Neurophenols Consortium

1 Univ.de Bordeaux, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, Bordeaux, France.

2 INRA, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, Bordeaux, France.

3 Activ'Inside, Libourne, France

**Correspondence:** Dr Pauline Lafenetre

Nutrition and Integrative Neurobiology, UMR 1286 INRA – Université de Bordeaux, Bâtiment UFR de Pharmacie 2<sup>e</sup> tranche, 2<sup>e</sup> étage, case courrier 34, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France.

Tel : +33 5 57 57 92 12 ; Fax: +33 5 57 57 12 27 ; E-mail : pauline.lafenetre@ipb.fr

**Running title: Learning strategies: age and polyphenols**

Number of words: 5490

Number of figures: 6



## **Abstract**

Spatial learning and memory deficits associated with hippocampal synaptic plasticity impairments are commonly observed during aging. Indeed, aged animals are mainly impaired in the use of spatial strategies whereas egocentric learning and memory may be preserved. In the Morris water maze, animals could solve the task using different strategies that can be categorized either as non-spatial or spatial strategies but the evolution of the strategies employed by aged mice has not yet been studied. Besides, the beneficial role of nutrition has recently been suggested to prevent age-related memory decline and dietary polyphenols have particularly been identified as potential functional food candidates. They could indeed potentiate the signaling pathways of synaptic plasticity underlying learning and memory. The aims of this study are (i) to better characterize the learning and memory deficits observed in aged mice according to their navigation patterns in the Morris water maze, (ii) to assess the effectiveness of a polyphenol-rich extract from grape and blueberry (Neurophenol<sup>TM</sup> extract) with high contents of flavonoids and stilbenes in the prevention of age-related cognitive decline and (iii) to better understand the neurobiological correlates of these behavioral effects. Learning deficits of aged mice have first been highlighted in the Morris water maze task. A polyphenol-enriched diet for 8 weeks has been able to reverse them and even to facilitate memory retention. Moreover, the analysis of the navigation strategies shows a delayed use of spatial strategies by aged mice whereas a polyphenol-rich extract supplementation may promote these strategies both in adult and aged mice. The hippocampal gene expression analysis shows that *CaMKII* mRNA levels are decreased with aging and that the polyphenol supplementation can reverse this alteration. Furthermore, the hippocampal *NGF* mRNA expression is increased in both adult and aged supplemented mice. Thus these data suggest that supplementation with polyphenols could be a potential nutritional way to prevent age-induced cognitive decline.

*Keywords:* Morris water maze, aging, polyphenols, spatial learning and memory, strategy, berries, NGF, CamKII

## **Introduction**

Spatial learning and memory can be assessed in rodents in many behavioral tasks in which they must learn to navigate in a novel environment to reach a specific location in an efficient and flexible manner. It is thus assumed that (i) the configuration of distal cues has to be integrated in a spatial cognitive map (Cain et al., 1997; Matthews and Best, 1997; Chapillon, 1999) and that (ii) this encoding relies on the integrity of the hippocampus (O'Keefe and Nadel, 1978; Morris et al., 1982). However, most of these tasks could also be successfully solved by alternative strategies, involving other brain areas like the striatum (Fouquet et al., 2013).

It appears difficult to determine the animals' strategies to complete the different tasks. Packard and McGaugh (1996) first provided evidence that in a cross-maze, the learned performance assessed in a probe test could reflect either a place or a response strategy under the control of the hippocampus and the striatum, respectively (Packard and McGaugh, 1996). Similarly, it has been suggested that during spatial learning in dry-land and in the Morris water maze, rats could use directional responding as well as place navigation when the platform location remains fixed throughout training and distal cues are available (Skinner et al., 2003). Another classification is established according to the involvement or not of the position of the body in the environment: an allocentric strategy relies on external cues independently of the subject's position whereas an egocentric strategy depends on the subject's position and on the point of introduction in the novel environment (White and McDonald, 2002). In this case, the animal reaches the goal simply by repeating a set of previously learned movements (Packard and Knowlton, 2002; White and McDonald, 2002). It is thus often assimilated to a cued-guided response learning based on stimulus-response-like associations (Packard and Knowlton, 2002; White and McDonald, 2002; Fouquet et al., 2011). The type of strategy used is thus largely influenced by the availability of information at the goal and surrounding areas and by the number of training trials (Chamizo et al., 2006). It has also been reported in the star maze a sequential egocentric strategy in which the hippocampus would encode the temporal order memory of successive choice points (Fouquet et al., 2010; Fouquet et al., 2013). Recently, it has also been described a series of strategies that have been observed in the Morris water maze and that are categorized in non-spatial versus spatial strategies according to the navigation patterns of the animals (Janus, 2004; Brody and Holtzman, 2006; Garthe et al., 2009; Ruediger et al., 2012). This analysis does not necessarily require a probe test in order to evaluate the used strategies and can be an efficient tool to understand learning deficits. Indeed, it has been useful to characterize spatial learning of transgenic mice (Wolfer and Lipp, 2000; Grootendorst et al., 2001; Lang et al., 2003; Janus, 2004) and of a rat model of brain injury (Sutherland et al., 1982; Brody and Holtzman, 2006).

The hippocampus is particularly affected during aging (Erickson and Barnes, 2003). Impairments in spatial memory have been observed not only in rodents but also in old monkeys (Lai et al., 1995; Rapp et al., 1997) and in elderly humans (Uttl and Graf, 1993; Wilkniss et al., 1997; Gazova et al., 2013). In a real-space adapted version of the Morris water maze for humans, it has been shown that the profile of spatial navigation learning in old adults over 70 is altered although aging did not affect egocentric navigation nor allocentric navigation in old adults over 60 (Gazova et al., 2013). Fouquet et al. have characterized the profile of mice spatial navigation in a star maze in order to detect the premises of pathological dementia: young mice use both allocentric and sequential egocentric strategies to solve the star maze task with similar efficiency. On the contrary, the use of these strategies is reduced in some impaired middle aged (10 months) mice, and absent in older (17 months) impaired

mice (Fouquet et al., 2011). However, the training protocols (massed vs. spaced) may influence the adoption of a strategy over another (Rick et al., 1996; Frick et al., 2003; Fouquet et al., 2011) and these studies cannot fully translate the evolution from one strategy to another strategy that would be more efficient and flexible. Evidence about how aging may influence this evolution that has been described in the Morris water maze (Janus, 2004; Brody and Holtzman, 2006; Ruediger et al., 2012) is still lacking.

Dietary habits or nutrients may exert beneficial effects on brain aging. Among “functional foods”, fruits and vegetables rich in polyphenols could delay age-related physiological and functional brain deficits in humans (Joseph et al., 2005; Gomez-Pinilla, 2008; Queen and Tollefsbol, 2010; Murphy et al., 2014) and in animals (Mandel and Youdim, 2004; Andres-Lacueva et al., 2005; Spencer, 2007; Shukitt-Hale et al., 2008; Spencer, 2009). Polyphenols are complex metabolites exclusively synthesized in the vegetal reign that are classified in four main families (flavonoids, phenolic acids, stilbenes and lignans) according to their structures (Manach et al., 2004). Polyphenols and particularly flavonoids and resveratrol have been shown to ameliorate learning and memory in both animals (Dinges, 2006; Haque et al., 2006; Kaur et al., 2008) and humans (Letenneur, 2004; Letenneur et al., 2007; Williams et al., 2008; Krikorian et al., 2010a; Krikorian et al., 2010b; Krikorian et al., 2012; Witte et al., 2014). Polyphenols may act on neuronal signaling cascades as the Erk/CREB pathway involved in synaptic plasticity and long-term potentiation (Williams et al., 2004; Schroeter et al., 2007; Spencer, 2007; Vauzour et al., 2007; Rendeiro et al., 2009). Flavonoid supplementations having a beneficial effect on spatial memory have also been shown to modulate specific signaling proteins like Akt (Williams et al., 2008; Rendeiro et al., 2013a), calcium calmodulin kinases (CaMKII or CaMKIV) (Williams et al., 2008; Li et al., 2009a; Li et al., 2009b), or Erk (Williams et al., 2008; Rendeiro et al., 2013a), controlling the activation of CREB and the increases of BDNF (Williams et al., 2008; Li et al., 2009a; Li et al., 2009b; De Nicolo et al., 2013; Rendeiro et al., 2013a; Rendeiro et al., 2013b) and of NGF (De Nicolo et al., 2013) in the hippocampus. Plant extracts that contain flavonoids and stilbenes could thus be nutrients with potential properties against age-related cognitive decline; but their specific benefits on navigational patterns are unknown.

The aims of this study are (i) to better characterize the learning and memory deficits observed in aged mice according to their navigation patterns in the Morris water maze, (ii) to assess the effectiveness of dietary polyphenols with high contents of flavonoids and resveratrol in the prevention of age-related cognitive decline and (iii) to look for the neurobiological correlates underlying these effects.

## Materials and Methods

### Animals and diet

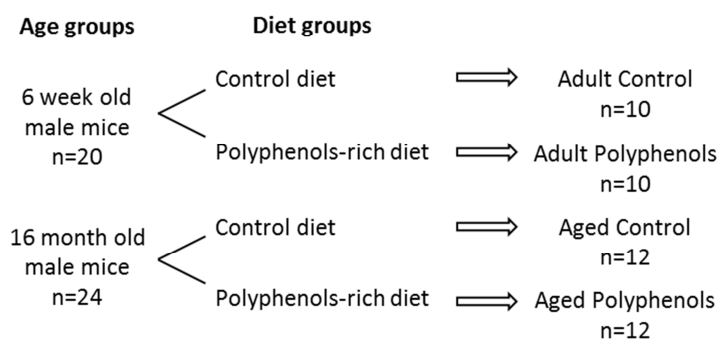
For this study 20 adult (6-week old) and 24 aged (16-month old) male C57Bl/6J mice were purchased from Janvier (France). They were singly housed in a room with a constant airflow system, controlled temperature (21-23°C), and a 12h light/dark cycle. Mice were given *ad libitum* access to food and water. Mice were randomly divided into four experimental groups (**Figure 1A**). One group of adult mice (n=10) and one of aged mice (n=12) were fed with a control diet exempt of polyphenols (INRA Jouy-en-Josas, France), whereas the two other groups of adult mice (n=10) and old mice (n=12) received a polyphenol-enriched diet (INRA Jouy-en-Josas, France) containing 0.51% of the Neurophenol<sup>TM</sup> extract (Activ'Inside, France). The composition of the control diet was the same as the polyphenol-enriched diet,

except for polyphenols content. Diets started as soon as mice arrived in the laboratory (i.e. at the age of 6 weeks for adult mice and 16 months for aged mice) and continued throughout the entire experiment (8 weeks / 6 weeks before behavioral testing). The Neurophenol<sup>TM</sup> extract (Activ'Inside, France) provides flavonoids (monomers, oligomers, flavonols, anthocyanidins, and phenolic acids) and resveratrol from Grape Extract (fruit, *Vitis vinifera*) (Activ'Inside, France) and Wild Blueberry Extract (fruit, *Vaccinium angustifolium*) (NutraCanada, Canada). All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC) and the French national Committee (87/848) recommendations, and have been approved by the Animal Care and Use Committee of Bordeaux under the N°5012085-A.

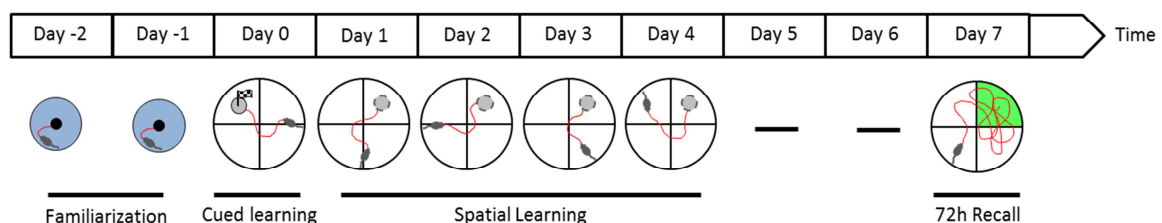
### Body weight and food intake

Body weight and food intake were monitored weekly during the 8-week supplementation period.

#### A. Experimental groups



#### B. Morris water maze procedure



**Figure 1 | Experimental design.** (A) 6-week-old and 6-month-old mice were either fed a control diet or a polyphenol-rich diet (0,51% Neurophenol) for 8 weeks (6 weeks before performing the Morris water maze test). (B) A 2-day familiarization period was performed before the one day cued learning. Spatial learning has then been evaluated for 4 days. 72h after the last learning trial, a probe test was performed in order to evaluate spatial memory.

### Spatial learning and reference memory in the Morris water maze

**Training phase.** Spatial learning and memory were assessed in a Morris water maze (150cm in diameter, 50cm-high) filled with white water (22°C) and surrounded with distal extramaze cues (**Figure 1B**). Before being trained, animals were handled 1min a day for two days. Mice were then familiarized to water and swimming during two familiarization days (day -1 and day -2) where they had to find a visible platform in the center of a small pool (60cm diameter) surrounded with curtains. On day 0, to evaluate visuomotor deficits, mice were given 6 trials

(90s cut-off) to find a visible platform pointed out with a cue in the Morris water maze that was surrounded with white curtains. One aged control mouse was excluded from the experiment because it did not find the platform during this cued phase (floating). During training (days 1 to 4), animals were required to locate the submerged platform by using distal extramaze cues. They were trained for six trials a day (90s cut-off) with an intertrial interval of 5min for 4 consecutive days. In order to facilitate spatial learning, mice were introduced from four different starting points, in a randomized daily order. Speed, latency and distance to reach the platform as well as the swim path of each trial were recorded by Imetronics videotrack system (France). One adult control mouse, two adult supplemented mice, one aged control mouse and one aged supplemented mouse were excluded from the experiment because they were not searching for the platform.

*Probe test.* 72h after the last training session, the platform was removed from the pool and spatial memory was evaluated for 60s. The percentage of time spent in the quadrant where the platform was located during training (target quadrant) was recorded using the SMART system (San Diego Instruments).

### **Analysis of navigation strategies**

For each trial of the training phase, the navigation path was analyzed and assigned to one of the twelve strategies by two experimenters, blind to the groups. The categorization scheme (**Figure 2**) was adapted from those developed previously (Brody and Holtzman, 2006; Garthe et al., 2009; Ruediger et al., 2012). These strategies were divided into two main categories: non-spatial vs. spatial strategies. *Non-spatial strategies* included first ‘global search’ strategies: ‘peripheral looping’ (persistent swimming around the outer 15cm of the pool, including thigmotaxis), ‘random’ (searching the entire tank, >75% surface coverage), ‘circling’ (swimming in tight circles, possibly with some net directional movement), and then ‘local search’ strategies: ‘scanning’ (searching restricted to a limited, often central, portion of the tank, <75% and >15% surface coverage), ‘chaining’ (circular swimming at an approximately fixed distance greater than 15cm from the wall), ‘repeated incorrect’ (swimming in a precise direction that does not contain the platform and repeat the same trajectory several times), and ‘focal incorrect’ (searching intently a small portion of the tank that does not contain the platform). *Spatial strategies* included ‘repeated correct’ (swimming in direction of the platform and repeat the same trajectory several times), ‘spatial indirect’ (swimming indirectly to the platform with eventually one to two loops), ‘spatial direct’ (swimming directly to the platform), and ‘focal correct’ (swimming and searching intently in the quadrant containing the platform).

### **Tissue preparation**

One hour after the probe test, mice were euthanized by cervical dislocation and decapitated. Brains were rapidly removed and hippocampi were dissected and frozen with liquid nitrogen before being stored at -80°C until assay.

### **Quantitative Real-Time PCR analysis**

Hippocampi were used to measure hippocampal gene expression. RNA extraction was conducted using TRIzol reagent (Invitrogen, France) according to the manufacturer’s instructions. The integrity of the purified RNA was verified using the RNA 6000 Nano LabChip kit in combination with the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, France). The concentrations of RNA were determined by using a Nanodrop ND-1000 (Labtech, France). Using oligodT and random primers (Promega, France), cDNA was synthesized from 1µg of

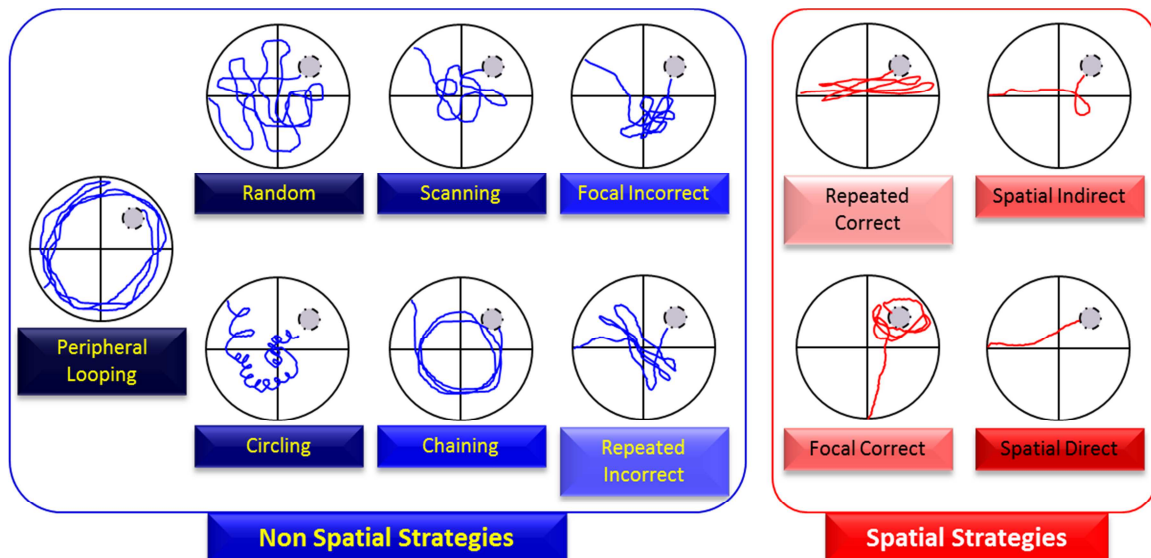
RNA with ImPromII reverse transcriptase (Promega, France) according to the manufacturer's protocol. The real-time PCR was performed using the LightCycler 480 system with a 96-well format (Roche Diagnostics, Germany) in a volume of 20 $\mu$ L, containing 1X LightCycler 480 SYBR Green I Master solution, 0.5 $\mu$ M of each primer and 6 $\mu$ L of cDNA. The forward and reverse primer sequences and the amplicon size are summarized in **Table 1**. The results are expressed as the target/reference ratio divided by the target/reference ratio of the calibrator.

Gene name	Nucleotide sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)
Actin	F: AAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC R: AGGATGCAGAAGGAGATTACTGC	220
Erk1	F: TCCCCATAGCCTGAGTGATGAG R: CCATTCCAGAACGGTCTACCAGA	102
Erk2	F: TTCCCAAATGCTGACTCCAAAG R: AAGTCGTCCAACCTCCATGTCAAAC	179
Akt	F: CGACGTAGCCATTGTGAAGG R: AGGTGCCATCGTTCTTGAGG	98
CaMKII	F: AGATGTGCGACCCTGGAATGAC R: AGTGATGCGGATATAGGCGATGC	194
BDNF	F: AACCATAAGGACGCGGACTTG R: TTGACTGCTGAGCATCACCC	51
NGF	F: ATCAAGGGCAAGGAGGTGACAG R: GAGTCCAGTGTTTGGAGTCGATG	143

**Table 1 | Forward and reverse primer sequences and amplicon size.** *Actin*, *Extracellular signal-regulated kinases (ERK)*, *Protein kinase B (Akt)*, *Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)*, *brain-derived neurotrophic factor (BDNF)*, *nerve growth factor (NGF)*.

### Statistical analysis

All results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Food intake, body weight gain, swim speed, probe test comparisons and PCR data were analyzed using a 2-way ANOVA (with 2 factors: age and diet) followed by a *post-hoc* Fisher PLSD test when appropriate. Spatial learning and search strategy analysis were analyzed using a 3-way ANOVA with repeated measures (age, diet and days) followed by a *post-hoc* Fisher PLSD test. Probe test comparisons of each group with chance level (25%) have been performed with a one sample t-test.



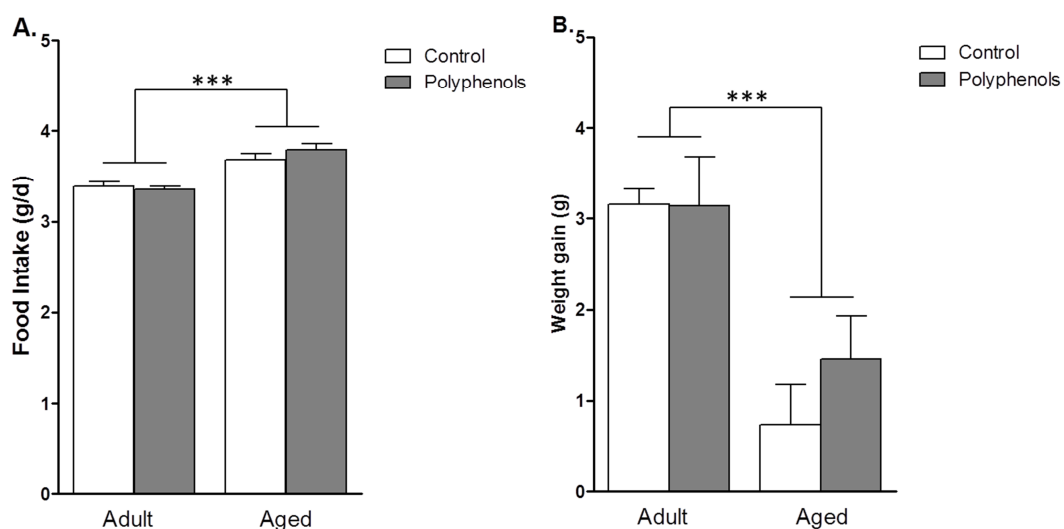
**Figure 2 | Learning in the Morris water maze: different search strategies.** Representative path patterns that reflect non-spatial (blue) or spatial (red) strategies used to reach the hidden platform (filled grey circle). Operational definitions of individual strategies are described in the method section.

## Results

### 1. Effects of age and polyphenols-rich diet on food intake and weight gain

Food intake and weight gain were measured along the 8 weeks of diet exposure. A 2-way ANOVA on average food intake revealed an effect of age [ $F(1,32)=84.451$ ,  $p<0.0001$ ], but no effect of diet [ $F(1,32)=0.724$ , n.s.] and no age x diet interaction [ $F(1,32)=12.387$ , n.s.] (**Figure 3A**). Indeed, aged mice consume more food than adult mice whatever the diet.

A 2-way ANOVA on average body weight gain revealed an age effect [ $F(1,32)=20.958$ ,  $p<0.0001$ ], no diet effect [ $F(1,32)=1.587$ , n.s.], and no age x diet interaction [ $F(1,32)=0.007$ , n.s.] showing that adult mice gain more weight than aged mice regardless of the diet (**Figure 3B**).



**Figure 3 | Effects of 8 weeks of polyphenol supplementation on food intake (A) and body weight gain (B).** (A) Aging increases food intake but polyphenols do not impact on. (B) Adult mice gain more weight during the 8-week supplementation than aged mice but polyphenols do not modified this weight gain. \*\*\* $p < 0.001$  by Two-Way ANOVA.  $n = 8-10$  per group.

## **2. Effects of age and polyphenols-rich diet on spatial learning and memory**

To evaluate visuo-motor capabilities mice were first trained to find a visible platform in the Morris water maze without distal cues. The ANOVA on swim speed over the trials revealed an age effect [ $F(1,32)=4.325$ ,  $p<0.05$ ], with no effect of diet [ $F(1,32)=0.354$ , n.s.] and no interaction age x diet [ $F(1,32)=0.959$ , n.s.] (data not shown). Indeed, aged mice swam slower than adult mice, under a control or a polyphenols-rich diet. As the latency to reach the platform is dependent on the swimming speed, the distance covered to reach the platform has been chosen as a more appropriate measure to show the acquisition rate for this cued task and for spatial learning.

A 2-way ANOVA on the distance to reach the visible platform indicated no effect of age [ $F(1,32)=2.935$ , n.s.], no effect of diet [ $F(1,32)=0.012$ , n.s.], and no age x diet interaction [ $F(1,32)=0.905$ , n.s.] suggesting that all groups travelled similar distances to reach the visible platform and that all groups had similar visual capabilities.

Mice were trained in the spatial version of the Morris water maze to test the effects of age and polyphenols on spatial learning and memory. A 3-way ANOVA on the distance to reach the platform along the four days of training showed a day effect [ $F(3,96)=39.862$ ,  $p<0.0001$ ], an age effect [ $F(1,32)=5.256$ ,  $p<0.05$ ] and a diet effect [ $F(1,32)=4.182$ ,  $p<0.05$ ] but no age x diet interaction [ $F(1,32)=2.137$ , n.s.] (**Figure 4A**). The distance to reach the platform became progressively shorter over the four days indicating that all groups learned the platform location. However, aged mice travelled significantly longer distance than adult mice to find the platform, revealing spatial learning deficits. Moreover, mice receiving a polyphenols-rich diet showed better performance than mice under a control diet. Interestingly, this diet effect was observed not only in aged mice which performed as well as adult control mice, but also in adult mice receiving polyphenols-rich diet which seem to perform better especially on the first day of training. On the last training day, all groups reached the platform within similar distances.

Spatial memory was assessed during the probe test: one sample test comparing to the chance level (25%) revealed that all groups swam significantly more time in the target quadrant (adult control:  $p<0.05$ ; adult supplemented:  $p<0.05$ ; aged control:  $p<0.05$ ; aged supplemented:  $p<0.001$ ) (**Figure 4B**). Besides, a 2-way ANOVA performed on the percentage of time spent in the target quadrant revealed no effect of age [ $F(1,32)=1.335$ , n.s.], no effect of diet [ $F(1,32)=3.041$ , n.s.] and no interaction age x diet [ $F(1,32)=0.128$ , n.s.], suggesting that all four groups remembered as well the location of the platform. However, polyphenols may tend to improve spatial memory ( $p=0,0908$ ).

## **3. Effects of age and polyphenols-rich diet on strategies used to perform Morris water maze learning**

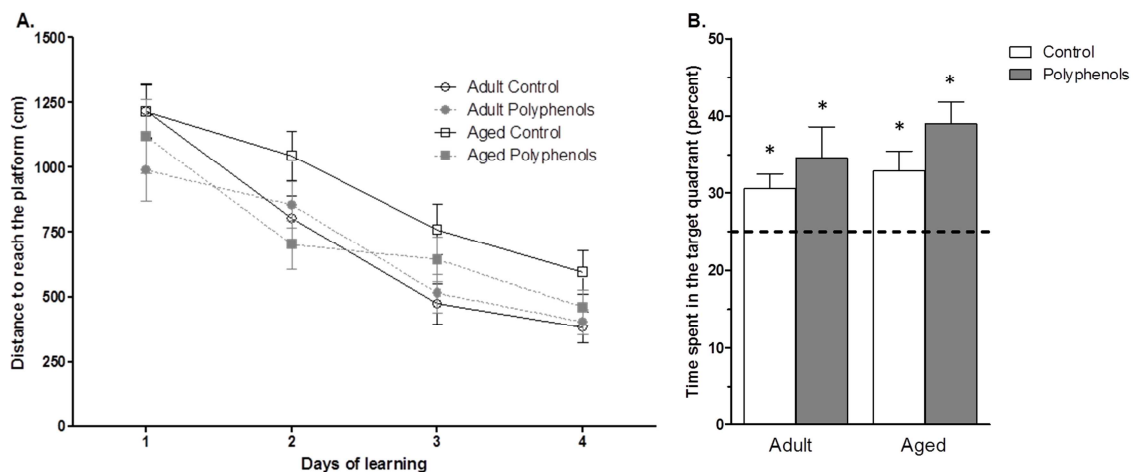
In order to better characterize the age-induced spatial learning deficits and whether dietary polyphenols could be beneficial, the navigation path of each trial was analyzed (**Figure 5A**). Consistent with previous reports (Morris, 1984; Wolfer and Lipp, 2000; Janus, 2004; Ruediger et al., 2012) the detailed analysis of navigation path revealed that progressively mice applied qualitatively different search strategies along the learning phase. Indeed, adult control mice use first non-spatial strategies, beginning with global search



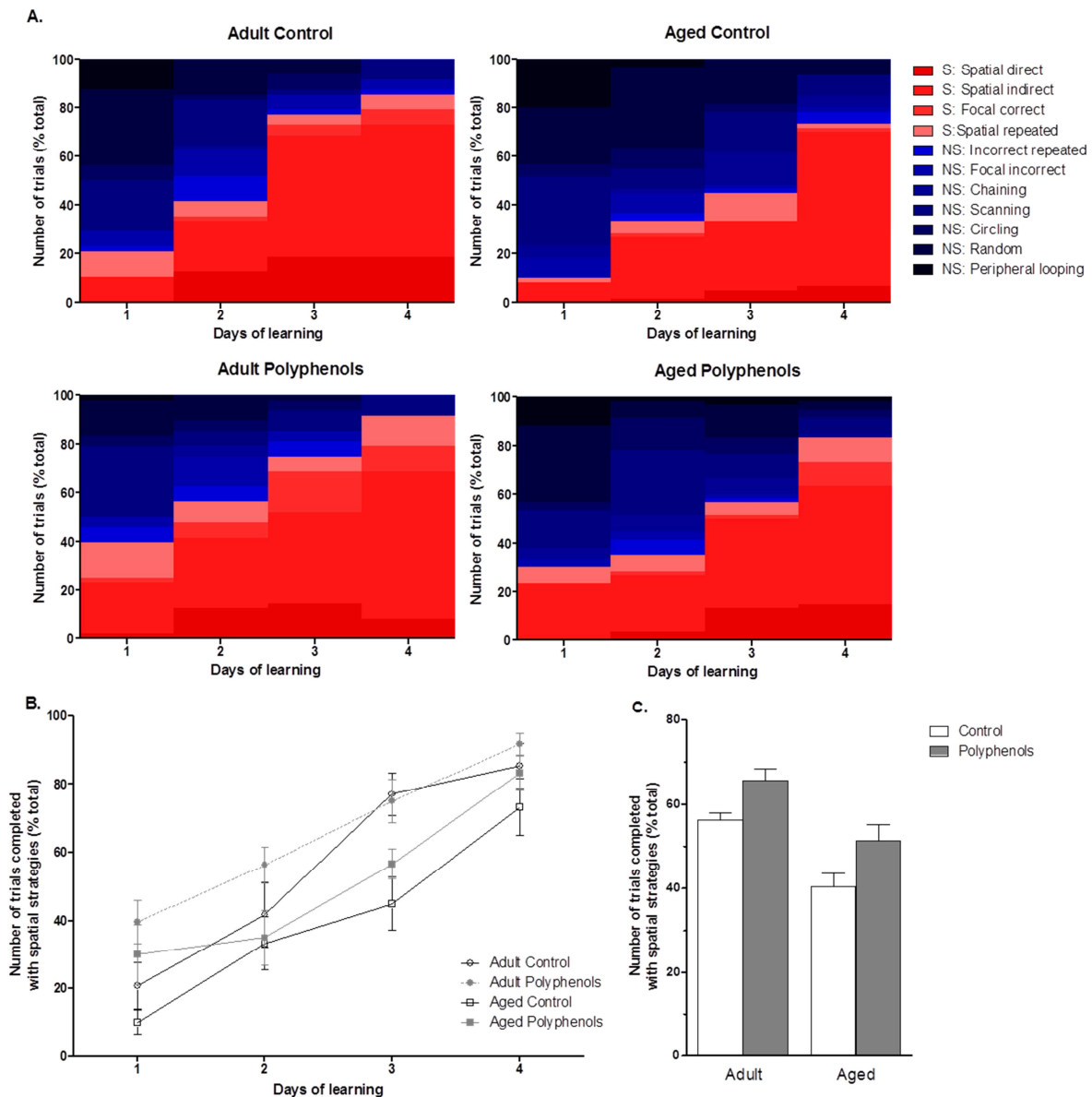
(random swim) and then local search strategies (scanning and chaining). The strategies “focal incorrect” and “repeated incorrect” categorized as non-spatial strategies are in fact intermediate as they translate that mice may use distal cues in an erroneous manner, suggesting that their cognitive map is not fully acquired. Then, during late phases appear spatial strategies (repetition of a direct path, indirect search, focal search, direct swim). The increase of the use of spatial strategies evolves continuously but not linearly over the trials and correlates with a decreased average distance to reach the platform.

A 3-way ANOVA on navigation strategies showed a day effect [ $F(3,96)=51.242$ ,  $p<0.0001$ ] indicating an evolution from non-spatial to spatial strategies for the four groups over the learning days as more and more trials are solved using one of the four spatial strategies (**Figure 5B**). Moreover, it revealed an age effect [ $F(1,32)=23.116$ ,  $p<0.0001$ ] and a diet effect [ $F(1,32)=10.345$ ,  $p=0.0030$ ]. These data suggest that aged mice take more time to adopt spatial strategies than adult mice (only 50% of aged control mice and 60% of aged supplemented used a spatial strategy on the first day) and that mice under polyphenols-rich diet are more prone to use spatial strategies than mice under control diet. This diet effect is principally observed in the first learning day for adult mice where an ANOVA revealed a significant diet effect [ $F(1,212)=11,350$ ,  $p=0.0009$ ] (**Figure 5B**): indeed, 100% of the adult mice consuming polyphenols were able to use one of the spatial strategies within the six first trials whereas only 62,5% of adult mice under the control diet did so.

This is confirmed when all trials over the four learning days are considered: indeed, adult control mice used a spatial strategy in 56% of the trials, adult mice with polyphenols in 61%, aged control mice in nearly 44% and aged mice under polyphenols-rich diet in 51% (age effect [ $F(1,32)=23.116$ ,  $p<0.0001$ ], diet effect [ $F(1,32)=10.345$ ,  $p=0.0030$ ], age x diet effect [ $F(1,32)=0.054$ , n.s.]) (**Figure 5C**).



**Figure 4 | Effects of 8 weeks of polyphenol supplementation on spatial learning (A) and memory (B).** (A) Distance covered to reach the hidden platform over the 4 consecutive days of spatial learning (spatial learning; blocks of trials for each training day are averaged). Aged mice exhibit longer distance compared to adult mice to reach the platform during acquisition and mice fed with the polyphenols enriched diet travel less distance to reach the platform than mice under control diet. (B) Percentage of time spent by mice in the target quadrant (Probe test). The dotted line corresponds to chance level (25%). All groups can remember the platform location spending more time in the target quadrant and the polyphenols enriched diet tends to ameliorate retention. \* $p < 0.05$  vs chance level.  $n = 8-10$  per group.

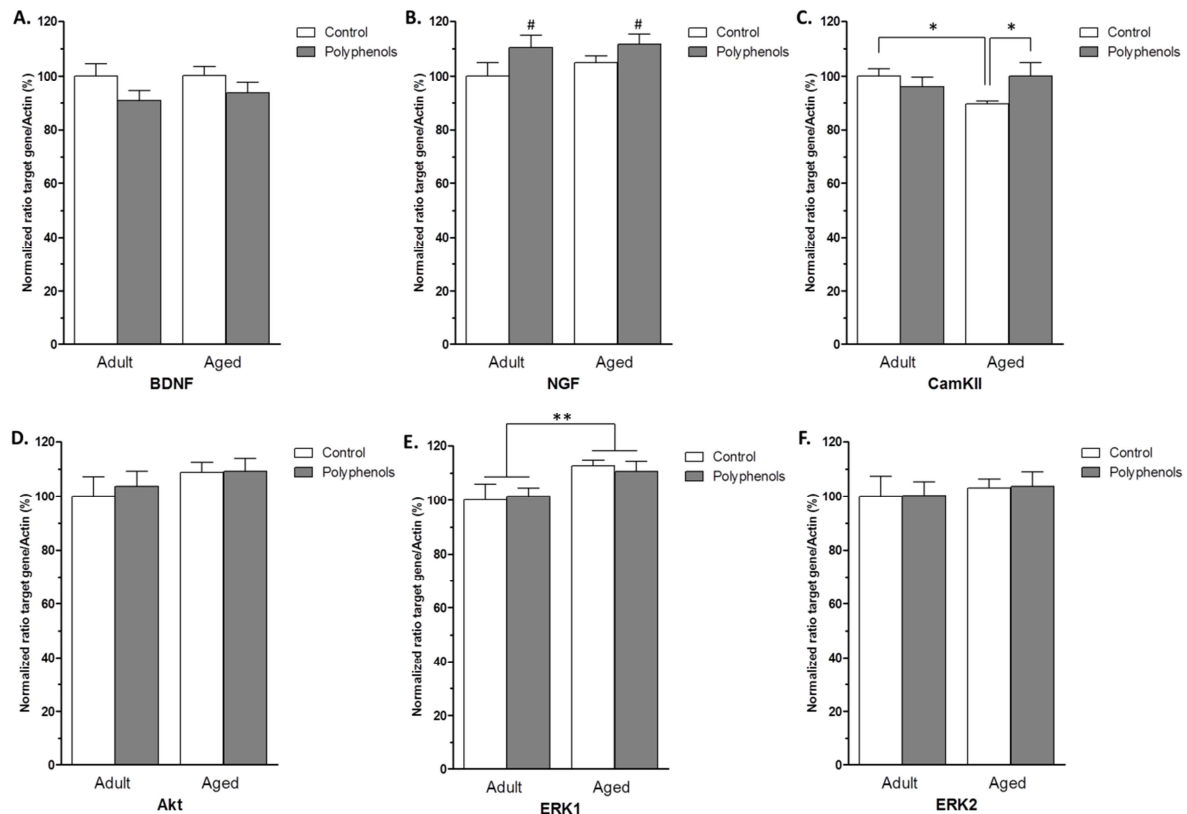


**Figure 5 | Effects of 8 weeks of polyphenol supplementation on search strategies during spatial learning in the Morris water maze.** (A) Search strategies used during learning. Non spatial strategies are represented in blue colors and spatial strategies in red colors. (B) All groups show an evolution of the use of non-spatial to spatial strategies. (C) Adult mice exhibit more use of spatial strategies than aged mice. Moreover mice fed with the polyphenols enriched diet performed more spatial strategies than mice under control diet. \*\*\* $p < 0.001$ ; # $p < 0.05$  by Three-Way ANOVA.  $n = 8-10$  per group.

#### 4. Effects of age and polyphenols-rich diet on hippocampal gene expression

To study the neurobiological correlates associated with the age-induced spatial deficits and the polyphenols-induced behavioral improvements, the mRNA levels of proteins involved in synaptic plasticity were measured (**Figure 6A**). A 2-way ANOVA performed on the mRNA expression of hippocampal *NGF* revealed a diet effect [ $F(1,24)=0.042$ ,  $p < 0.05$ ]: indeed, an increase in mRNA *NGF* levels was observed both in adult and aged mice fed with

a polyphenol-rich diet. However, no effect of age or diet was found on the *BDNF* mRNA levels (**Figure 6B**). Moreover, an ANOVA on hippocampal *CamKII* expression revealed an age x diet interaction [ $F(1,28)=0.056$ ,  $p<0.05$ ] and *post-hoc* Fisher PLSD test showed that the mRNA levels observed in aged control mice were different from those of the adult control mice ( $p=0.0358$ ) and from those of the aged polyphenols mice ( $p=0.0276$ ) (**Figure 6C**), suggesting that a decrease of hippocampal *CamKII* mRNA expression in aged mice could be offset by a supplementation with polyphenols. Besides, no difference in *Akt* expression was found (**Figure 6D**). The ANOVA on *ERK1* mRNA levels revealed an age effect [ $F(1,25)=0.073$ ,  $p<0.01$ ] with an increased expression in aged animals (**Figure 6E**) whereas no effect of age or diet was observed on the *ERK2* gene expression (**Figure 6F**).



**Figure 6 | Effects of a polyphenol supplementation on hippocampal plasticity-related gene expression.** (B) NGF mRNA expression increases significantly in the hippocampus of supplemented animals. (C) Age decreases CamKII mRNA levels which are restored by the polyphenol-rich diet. (E) Age increase ERK1 mRNA levels but no effect of polyphenols was observed. (A) (D) (F) No differences induced by age or diet were found for ERK2, Akt and BDNF mRNA levels. \*\* $p<0.01$ ; \* $p<0.05$ ; # $p<0.05$  by Two-way ANOVA.  $n=6-10$  per group.

## Discussion

In the present study, the categorization of navigation strategies allowed us to demonstrate for the first time that aged mice take more time to adopt spatial strategies to solve the Morris water maze. The learning impairments observed in aged mice are associated with decreased hippocampal *CaMKII* mRNA levels which are restored with the polyphenol-rich extract supplementation. On the contrary, a supplementation in polyphenols can facilitate the use of spatial strategies by both adult and aged mice and this could be linked to an increase of hippocampal *NGF* expression in polyphenols-supplemented animals.

The Morris water maze is considered as a test of spatial learning and memory (Morris et al., 1982; Morris, 1984) but this task can be solved by alternative non-spatial strategies. Consistent with previous reports (Morris, 1984; Wolfer and Lipp, 2000; Janus, 2004; Ruediger et al., 2012) adult control mice completed the task using different search strategies along the learning phase, starting from non-spatial strategies, then intermediate strategies like “focal incorrect” and “repeated incorrect” to switch progressively to spatial strategies (repetition of a direct path, indirect search, focal search, direct swim). The increase of the use of spatial strategies evolves continuously but not linearly over the trials as mice may alternate non-spatial and spatial strategies over consecutive trials.

Moreover, we have found that this navigation pattern evolution is influenced by age and diet. Previous studies have shown that the Morris water maze task is particularly sensitive to cognitive deficits related to aging (Frick et al., 1995; Lindner, 1997; Wolff et al., 2002; de Fiebre et al., 2006). Usually aged mice present both learning and memory deficits but aged mice could present learning deficits without memory deficits (van Praag et al., 2005). Age has already been suggested to specifically affect spatial allocentric and sequential egocentric strategies in mice (Fouquet et al., 2011). However, it is the first time that age has been shown to particularly delay the evolution from non-spatial to spatial strategies. On the contrary, a supplementation in polyphenols seems to promote the use of spatial strategies.

The analysis of the navigation strategies allows a more thorough knowledge on the acquisition of spatial memory and permits to put on the fore subtle learning differences that could induce a lack of flexibility that is not revealed by a probe test. Here, longer escape distance to reach the platform travelled by aged mice does not reflect a constant random search of the entire surface area of the pool, which would have indicated a complete lack of spatial learning abilities. It rather shows that some aged mice rely on persistent performance of an alternative strategy that is successful to reach the escape platform but that could appear less efficient if the conditions change. Thus they take more trials to switch to spatial strategies; indeed, the first use of spatial strategies by aged mice would appear later and most of them would not use exclusively spatial strategies even on the last training day. In our conditions, aged control mice could remember the previous location of the platform but they may not be able to navigate in this novel environment as efficiently as adult control mice and they may not be able to use their cognitive map in a flexible manner whereas supplemented animals would.

In this study, it could be hypothesized that hippocampal alterations in aged mice impede the use of spatial strategies: aged mice would thus solve the task using preferentially striatum-dependent strategies. Even though rodents may preferentially use spatial strategies because they could be more efficient and flexible (Packard and McGaugh, 1996; Devan et al., 1999; Colombo et al., 2003; Yin and Knowlton, 2004), when the hippocampus is altered, these navigational strategies may not be possible or too costly. On the contrary, polyphenols

could preserve the involvement of the hippocampus so that hippocampal-dependent strategies are promoted and age-related deficits reduced.

The neurobiological basis for differences in navigation patterns is not fully understood but based on previous studies it is possible to hypothesize that differential activations of the hippocampus and the striatum during the learning phase could explain this evolution. Indeed, Colombo *et al.* supports the view that the hippocampus and the striatum act in parallel during the acquisition of the task (Colombo *et al.*, 2003). This could be visualized by immunohistochemistry. Sustained hippocampal expression of Fos is found in mice and rats that predominantly use allocentric strategies (Passino *et al.*, 2002; Colombo *et al.*, 2003). Phosphorylated CREB immunoreactivity (pCREB-IR) is also increased in the hippocampus of rats that used an allocentric spatial strategy to solve a radial arm maze task, whereas pCREB-IR is increased in the striatum of rats that used an egocentric response strategy (Colombo *et al.*, 2003).

In order to study the effects of age on learning and memory, 19-month old to 24-month old mice are usually used (van Praag *et al.*, 2005; de Fiebre *et al.*, 2006). However, 16 to 18-month old mice are a suitable model to verify the efficacy of a nutritional approach on non-pathological age-associated cognitive decline, as well as mild cognitive impairment (Pepeu, 2004; Bonhomme *et al.*, 2014). The effects of these polyphenols on spatial learning and memory were previously shown (3 month-old and 18 month-old) (van Praag *et al.*, 2007; Dal-Pan *et al.*, 2011b; Harada *et al.*, 2011; Rendeiro *et al.*, 2012; Rendeiro *et al.*, 2013b) but rarely with this strain of mice and at these ages.

Here we showed that the Neurophenol<sup>TM</sup> extract can improve spatial learning in both adult and aged mice. Unlike the aged control mice, aged mice that were fed the polyphenol-rich diet learned as quickly as adult control mice. The extract could thus prevent the occurrence of age-related learning deficits. The different families of polyphenols present in this extract are known to be effective on cognitive functions in particular flavanols (van Praag *et al.*, 2007; Rendeiro *et al.*, 2013b), anthocyanins (Williams *et al.*, 2008; Shan *et al.*, 2009; Rendeiro *et al.*, 2013a; Rendeiro *et al.*, 2013b; Tan *et al.*, 2014) and resveratrol (Abraham and Johnson, 2009; Dal-Pan *et al.*, 2011a; Harada *et al.*, 2011). First studied for its presence in red wine and its link with the French paradox (Sun *et al.*, 2002), resveratrol displays interest for its capacity to partially mimic caloric restriction and to extend lifespan, and to improve cognitive functions and to delay age-related cognitive impairments (Valenzano *et al.*, 2006; Barger *et al.*, 2008; Pearson *et al.*, 2008; Agarwal and Baur, 2011; Dal-Pan *et al.*, 2011b; Harada *et al.*, 2011). Only recently it has been established through the use of autoradiography, that specific polyphenol binding sites for resveratrol exist throughout the rat brain. It is though unclear what the molecular nature of those receptors might be (Han *et al.*, 2006). It has also been reported that the effects of resveratrol could be linked to its interaction with the sirtuins (Borra *et al.*, 2005; Donmez *et al.*, 2010; Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2014).

The hippocampus dysfunction during aging could be due to reduced persistence and magnitude of long-term potentiation of hippocampal synapses correlated with faster behavioral forgetting of spatial information (Barnes, 1979; Barnes and McNaughton, 1985; Deupree *et al.*, 1991; Barnes *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1993; Geinisman *et al.*, 1995; Rosenzweig *et al.*, 1997; Calhoun *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000). Polyphenols have been shown to impact on different neuronal signaling pathways involved in synaptic plasticity and long term potentiation (Williams and Grayer, 2004; Schroeter *et al.*, 2007; Spencer, 2007; Vauzour *et al.*, 2007; Rendeiro *et al.*, 2009) and particularly on the modulation of specific signaling pathways involved in learning and memory: our results are partially consistent with

these studies. Indeed, we have observed that *CaMKII* expression which decreases with aging can be recovered by an 8-week polyphenol supplementation. Moreover, the extract used in the present study permitted also to increase hippocampal *NGF* expression in both adult and aged mice. The role of *NGF* in the process of long term potentiation in the hippocampus has been demonstrated in several studies (Maguire et al., 1999; Hennigan et al., 2009). Moreover, an increase of *NGF* expression has been associated to an improvement of memory performances particularly in aged rodents (Fischer et al., 1991; Woolf et al., 2001). It could thus be hypothesized that the effects of the polyphenols are supported by this *NGF* mRNA level increase. Moreover, no modification in *Akt* or *BDNF* expression were observed although a decrease in mRNA and proteins *BDNF* and pro-*BDNF* have been reported in normal aging and in Alzheimer's disease (Phillips et al., 1991; Michalski and Fahnstock, 2003; Peng et al., 2005; Calabrese et al., 2013) and polyphenols would induce an increase in *BDNF* levels (Rendeiro et al., 2013b). Levels of *BDNF* are not constant during the postnatal period (Bath et al., 2013) and *BDNF* can be up- or down-regulated in the context of aging in a region-dependent and species specific manner (De Nicolo et al., 2013).

It would be interesting to know how polyphenols can act precisely to modify gene or protein expression. Han et al. have investigated the possible existence of specific polyphenol binding sites at the level of the cellular plasma membrane in rat brain (Han et al., 2006) also suggested by van Praag (van Praag, 2009). Their results suggest that the neuroprotective action of various polyphenols and resveratrol analogs could be mediated by the activation of common "receptor" binding sites particularly enriched at the level of the cellular plasma membrane in the rat brain.

The present results show that learning alterations in the early stage of aging can be overcome with a nutritional intervention. Numerous studies have focused their attention to develop new strategies for healthy aging (Joseph et al., 2009; van Praag, 2009). The definition of a primary prevention strategy has to focus on environmental risk factors such as food and nutrition. Hence, the definition of such a nutritional strategy would attempt to promote the maintenance of a satisfactory cognitive state in elderly subjects and to avoid or at least delay any evolution towards dementia. Moreover, several studies have revealed the interest of polyphenols in the prevention of the age-related cognitive decline (Mandel and Youdim, 2004; Andres-Lacueva et al., 2005; Spencer, 2007; Shukitt-Hale et al., 2008; Abraham and Johnson, 2009; Spencer, 2009; Dal-Pan et al., 2011b; Harada et al., 2011). Our data show that a supplementation with polyphenols from grape and blueberry could improve learning capacity through the *NGF* expression. Moreover, the biomolecular analyses have shown that aging alters *CaMKII* gene expression and that polyphenols can restore this expression. However, we have focused our investigation on spatial learning but other potential effects on other kinds of memory could be studied more in details. Furthermore, future investigations are still needed to better determine how polyphenols act at the molecular level to modulate gene expression which potentially leads to improved cognitive performance.

## Acknowledgments

This work has been supported by the Conseil Régional d'Aquitaine, the FUI. The authors would like to thank Mathieu Cadet and Philippe Birac for animal care. We also are grateful to Damien Bonhomme, Serge Alfos and Katia Touyarot for their technical contribution and the Neurophenols consortium.

## Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## References

- Abraham, J., and Johnson, R.W. (2009). Consuming a diet supplemented with resveratrol reduced infection-related neuroinflammation and deficits in working memory in aged mice. *Rejuvenation Res* 12, 445-453. doi: 10.1089/rej.2009.0888.
- Agarwal, B., and Baur, J.A. (2011). Resveratrol and life extension. *Ann N Y Acad Sci* 1215, 138-143. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05850.x.
- Andres-Lacueva, C., Shukitt-Hale, B., Galli, R.L., Jauregui, O., Lamuela-Raventos, R.M., and Joseph, J.A. (2005). Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr Neurosci* 8, 111-120.
- Barger, J.L., Kayo, T., Vann, J.M., Arias, E.B., Wang, J., Hacker, T.A., Wang, Y., Raederstorff, D., Morrow, J.D., Leeuwenburgh, C., Allison, D.B., Saupe, K.W., Cartee, G.D., Weindruch, R., and Prolla, T.A. (2008). A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS One* 3, e2264. doi: 10.1371/journal.pone.0002264.
- Barnes, C.A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93, 74-104.
- Barnes, C.A., and McNaughton, B.L. (1985). An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses. *Behav Neurosci* 99, 1040-1048.
- Barnes, C.A., Rao, G., Foster, T.C., and McNaughton, B.L. (1992). Region-specific age effects on AMPA sensitivity: electrophysiological evidence for loss of synaptic contacts in hippocampal field CA1. *Hippocampus* 2, 457-468. doi: 10.1002/hipo.450020413.
- Bath, K.G., Schilit, A., and Lee, F.S. (2013). Stress effects on BDNF expression: effects of age, sex, and form of stress. *Neuroscience* 239, 149-156. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.074.
- Bonhomme, D., Pallet, V., Dominguez, G., Servant, L., Henkous, N., Lafenêtre, P., Higuieret, P., Béracochéa, D., and Touyarot, K. (2014). Retinoic acid modulates intrahippocampal levels of corticosterone in middle-aged mice: consequences on hippocampal plasticity and contextual memory. *Frontiers in Aging Neuroscience* 6. doi: 10.3389/fnagi.2014.00006.
- Borra, M.T., Smith, B.C., and Denu, J.M. (2005). Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem* 280, 17187-17195. doi: 10.1074/jbc.M501250200.
- Brody, D.L., and Holtzman, D.M. (2006). Morris water maze search strategy analysis in PDAPP mice before and after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 197, 330-340. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.10.020.
- Cain, D.P., Beiko, J., and Boon, F. (1997). Navigation in the water maze: the role of proximal and distal visual cues, path integration and magnetic field information. *Psychobiology* 25, 286-293.
- Calabrese, F., Guidotti, G., Racagni, G., and Riva, M.A. (2013). Reduced neuroplasticity in aged rats: a role for the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor. *Neurobiol Aging* 34, 2768-2776. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.014.
- Calhoun, M.E., Kurth, D., Phinney, A.L., Long, J.M., Hengemihle, J., Mouton, P.R., Ingram, D.K., and Jucker, M. (1998). Hippocampal neuron and synaptophysin-positive bouton number in aging C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging* 19, 599-606.
- Chamizo, V.D., Rodrigo, T., Peris, J.M., and Grau, M. (2006). The influence of landmark salience in a navigation task: an additive effect between its components. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 32, 339-344. doi: 10.1037/0097-7403.32.3.339.
- Chapillon, P. (1999). Very brief exposure to visual distal cues is sufficient for young mice to navigate in the Morris water maze. *Behav Processes* 46, 15-24. doi: 10.1016/S0376-6357(98)00057-6.

- Colombo, P.J., Brightwell, J.J., and Countryman, R.A. (2003). Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. *J Neurosci* 23, 3547-3554.
- Dal-Pan, A., Pifferi, F., Marchal, J., Picq, J.L., and Aujard, F. (2011a). Cognitive performances are selectively enhanced during chronic caloric restriction or resveratrol supplementation in a primate. *PLoS One* 6, e16581. doi: 10.1371/journal.pone.0016581.
- Dal-Pan, A., Terrien, J., Pifferi, F., Botalla, R., Hardy, I., Marchal, J., Zahariev, A., Chery, I., Zizzari, P., Perret, M., Picq, J.L., Epelbaum, J., Blanc, S., and Aujard, F. (2011b). Caloric restriction or resveratrol supplementation and ageing in a non-human primate: first-year outcome of the RESTRIKAL study in *Microcebus murinus*. *Age (Dordr)* 33, 15-31. doi: 10.1007/s11357-010-9156-6.
- De Fiebre, N.C., Sumien, N., Forster, M.J., and De Fiebre, C.M. (2006). Spatial learning and psychomotor performance of C57BL/6 mice: age sensitivity and reliability of individual differences. *Age (Dordr)* 28, 235-253. doi: 10.1007/s11357-006-9027-3.
- De Nicolo, S., Tarani, L., Ceccanti, M., Maldini, M., Natella, F., Vania, A., Chaldakov, G.N., and Fiore, M. (2013). Effects of olive polyphenols administration on nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the mouse brain. *Nutrition* 29, 681-687. doi: 10.1016/j.nut.2012.11.007.
- Deupree, D.L., Turner, D.A., and Watters, C.L. (1991). Spatial performance correlates with in vitro potentiation in young and aged Fischer 344 rats. *Brain Res* 554, 1-9.
- Devan, B.D., McDonald, R.J., and White, N.M. (1999). Effects of medial and lateral caudate-putamen lesions on place- and cue-guided behaviors in the water maze: relation to thigmotaxis. *Behav Brain Res* 100, 5-14.
- Dinges, D.F. (2006). Cocoa flavanols, cerebral blood flow, cognition, and health: going forward. *J Cardiovasc Pharmacol* 47 Suppl 2, S221-223.
- Donmez, G., Wang, D., Cohen, D.E., and Guarente, L. (2010). SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10. *Cell* 142, 320-332. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.020.
- Erickson, C.A., and Barnes, C.A. (2003). The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp Gerontol* 38, 61-69.
- Fischer, W., Bjorklund, A., Chen, K., and Gage, F.H. (1991). NGF improves spatial memory in aged rodents as a function of age. *J Neurosci* 11, 1889-1906.
- Fouquet, C., Babayan, B.M., Watilliaux, A., Bontempi, B., Tobin, C., and Rondi-Reig, L. (2013). Complementary Roles of the Hippocampus and the Dorsomedial Striatum during Spatial and Sequence-Based Navigation Behavior. *PLoS One* 8, e67232. doi: 10.1371/journal.pone.0067232.
- Fouquet, C., Petit, G.H., Auffret, A., Gaillard, E., Rovira, C., Mariani, J., and Rondi-Reig, L. (2011). Early detection of age-related memory deficits in individual mice. *Neurobiol Aging* 32, 1881-1895. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.11.001.
- Fouquet, C., Tobin, C., and Rondi-Reig, L. (2010). A new approach for modeling episodic memory from rodents to humans: the temporal order memory. *Behav Brain Res* 215, 172-179. doi: 10.1016/j.bbr.2010.05.054.
- Frick, K.M., Baxter, M.G., Markowska, A.L., Olton, D.S., and Price, D.L. (1995). Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze. *Neurobiol Aging* 16, 149-160.
- Frick, K.M., Stearns, N.A., Pan, J.Y., and Berger-Sweeney, J. (2003). Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice. *Learn Mem* 10, 187-198. doi: 10.1101/lm.50703.
- Garthe, A., Behr, J., and Kempermann, G. (2009). Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One* 4, e5464. doi: 10.1371/journal.pone.0005464.
- Gazova, I., Laczo, J., Rubinova, E., Mokrisova, I., Hyncicova, E., Andel, R., Vyhnaek, M., Sheardova, K., Coulson, E.J., and Hort, J. (2013). Spatial navigation in young versus older adults. *Front Aging Neurosci* 5, 94. doi: 10.3389/fnagi.2013.00094.



- Geinisman, Y., Detoledo-Morrell, L., Morrell, F., and Heller, R.E. (1995). Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Prog Neurobiol* 45, 223-252.
- Gomez-Pinilla, F. (2008). Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nat Rev Neurosci* 9, 568-578. doi: 10.1038/nrn2421.
- Grootendorst, J., De Kloet, E.R., Dalm, S., and Oitzl, M.S. (2001). Reversal of cognitive deficit of apolipoprotein E knockout mice after repeated exposure to a common environmental experience. *Neuroscience* 108, 237-247.
- Han, Y.S., Bastianetto, S., Dumont, Y., and Quirion, R. (2006). Specific plasma membrane binding sites for polyphenols, including resveratrol, in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 238-245. doi: 10.1124/jpet.106.102319.
- Haque, A.M., Hashimoto, M., Katakura, M., Tanabe, Y., Hara, Y., and Shido, O. (2006). Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *J Nutr* 136, 1043-1047.
- Harada, N., Zhao, J., Kurihara, H., Nakagata, N., and Okajima, K. (2011). Resveratrol improves cognitive function in mice by increasing production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. *J Nutr Biochem* 22, 1150-1159. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.09.016.
- Hennigan, A., Callaghan, C.K., Kealy, J., Rouine, J., and Kelly, A.M. (2009). Deficits in LTP and recognition memory in the genetically hypertensive rat are associated with decreased expression of neurotrophic factors and their receptors in the dentate gyrus. *Behav Brain Res* 197, 371-377. doi: 10.1016/j.bbr.2008.09.037.
- Janus, C. (2004). Search strategies used by APP transgenic mice during navigation in the Morris water maze. *Learn Mem* 11, 337-346. doi: 10.1101/lm.70104.
- Joseph, J., Cole, G., Head, E., and Ingram, D. (2009). Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *J Neurosci* 29, 12795-12801. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3520-09.2009.
- Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., and Casadesus, G. (2005). Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am J Clin Nutr* 81, 313S-316S.
- Kaur, T., Pathak, C.M., Pandhi, P., and Khanduja, K.L. (2008). Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. *Brain Cogn* 67, 25-30. doi: 10.1016/j.bandc.2007.10.003.
- Krikorian, R., Boespflug, E.L., Fleck, D.E., Stein, A.L., Wightman, J.D., Shidler, M.D., and Sadat-Hossieny, S. (2012). Concord grape juice supplementation and neurocognitive function in human aging. *J Agric Food Chem* 60, 5736-5742. doi: 10.1021/jf300277g.
- Krikorian, R., Nash, T.A., Shidler, M.D., Shukitt-Hale, B., and Joseph, J.A. (2010a). Concord grape juice supplementation improves memory function in older adults with mild cognitive impairment. *Br J Nutr* 103, 730-734. doi: 10.1017/S0007114509992364.
- Krikorian, R., Shidler, M.D., Nash, T.A., Kalt, W., Vinqvist-Tymchuk, M.R., Shukitt-Hale, B., and Joseph, J.A. (2010b). Blueberry supplementation improves memory in older adults. *J Agric Food Chem* 58, 3996-4000. doi: 10.1021/jf9029332.
- Lai, Z.C., Moss, M.B., Killiany, R.J., Rosene, D.L., and Herndon, J.G. (1995). Executive system dysfunction in the aged monkey: spatial and object reversal learning. *Neurobiol Aging* 16, 947-954.
- Lang, U.E., Lang, F., Richter, K., Vallon, V., Lipp, H.-P., Schnermann, J., and Wolfer, D.P. (2003). Emotional instability but intact spatial cognition in adenosine receptor 1 knock out mice. *Behavioural Brain Research* 145, 179-188. doi: 10.1016/s0166-4328(03)00108-6.
- Letenneur, L. (2004). Risk of dementia and alcohol and wine consumption: a review of recent results. *Biol Res* 37, 189-193.
- Letenneur, L., Proust-Lima, C., Le Gouge, A., Dartigues, J.F., and Barberger-Gateau, P. (2007). Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am J Epidemiol* 165, 1364-1371. doi: 10.1093/aje/kwm036.
- Li, Q., Zhao, H.F., Zhang, Z.F., Liu, Z.G., Pei, X.R., Wang, J.B., Cai, M.Y., and Li, Y. (2009a). Long-term administration of green tea catechins prevents age-related spatial learning and memory decline in C57BL/6 J mice by regulating hippocampal cyclic amp-response element binding

- protein signaling cascade. *Neuroscience* 159, 1208-1215. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.02.008.
- Li, Q., Zhao, H.F., Zhang, Z.F., Liu, Z.G., Pei, X.R., Wang, J.B., and Li, Y. (2009b). Long-term green tea catechin administration prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing Abeta1-42 oligomers and upregulating synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus. *Neuroscience* 163, 741-749. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.07.014.
- Lindner, M.D. (1997). Reliability, distribution, and validity of age-related cognitive deficits in the Morris water maze. *Neurobiol Learn Mem* 68, 203-220. doi: 10.1006/nlme.1997.3782.
- Maguire, C., Casey, M., Kelly, A., Mullany, P.M., and Lynch, M.A. (1999). Activation of tyrosine receptor kinase plays a role in expression of long-term potentiation in the rat dentate gyrus. *Hippocampus* 9, 519-526. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:5<519::AID-HIPO5>3.0.CO;2-Y.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727-747.
- Mandel, S., and Youdim, M.B. (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med* 37, 304-317. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.012.
- Matthews, D.B., and Best, P.J. (1997). Evidence for the flexible use of spatial knowledge in the rat. *Psychobiology* 25, 294-302.
- Michalski, B., and Fahnestock, M. (2003). Pro-brain-derived neurotrophic factor is decreased in parietal cortex in Alzheimer's disease. *Molecular Brain Research* 111, 148-154. doi: 10.1016/s0169-328x(03)00003-2.
- Moore, C.I., Browning, M.D., and Rose, G.M. (1993). Hippocampal plasticity induced by primed burst, but not long-term potentiation, stimulation is impaired in area CA1 of aged Fischer 344 rats. *Hippocampus* 3, 57-66. doi: 10.1002/hipo.450030106.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11, 47-60.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., and O'keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681-683.
- Murphy, T., Dias, G.P., and Thuret, S. (2014). Effects of diet on brain plasticity in animal and human studies: mind the gap. *Neural Plast* 2014, 563160. doi: 10.1155/2014/563160.
- O'keefe, J., and Nadel, L. (1978). "The hippocampus as a cognitive map", (ed.) C.P. Oxford University Press. (Oxford).
- Packard, M.G., and Knowlton, B.J. (2002). Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci* 25, 563-593. doi: 10.1146/annurev.neuro.25.112701.142937.
- Packard, M.G., and Mcgaugh, J.L. (1996). Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 65, 65-72. doi: 10.1006/nlme.1996.0007.
- Passino, E., Middei, S., Restivo, L., Bertaina-Anglade, V., and Ammassari-Teule, M. (2002). Genetic approach to variability of memory systems: analysis of place vs. response learning and fos-related expression in hippocampal and striatal areas of C57BL/6 and DBA/2 mice. *Hippocampus* 12, 63-75. doi: 10.1002/hipo.10007.
- Pearson, K.J., Baur, J.A., Lewis, K.N., Peshkin, L., Price, N.L., Labinskyy, N., Swindell, W.R., Kamara, D., Minor, R.K., Perez, E., Jamieson, H.A., Zhang, Y., Dunn, S.R., Sharma, K., Pleshko, N., Woollett, L.A., Csiszar, A., Ikeno, Y., Le Couteur, D., Elliott, P.J., Becker, K.G., Navas, P., Ingram, D.K., Wolf, N.S., Ungvari, Z., Sinclair, D.A., and De Cabo, R. (2008). Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab* 8, 157-168. doi: 10.1016/j.cmet.2008.06.011.
- Peng, S., Wu, J., Mufson, E.J., and Fahnestock, M. (2005). Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 93, 1412-1421. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03135.x.
- Pepeu, G. (2004). Mild cognitive impairment: animal models. *Dialogues Clin Neurosci* 6, 369-377.

- Phillips, H.S., Hains, J.M., Armanini, M., Laramée, G.R., Johnson, S.A., and Winslow, J.W. (1991). BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 7, 695-702.
- Queen, B.L., and Tollefsbol, T.O. (2010). Polyphenols and aging. *Curr Aging Sci* 3, 34-42.
- Rapp, P.R., Kansky, M.T., and Roberts, J.A. (1997). Impaired spatial information processing in aged monkeys with preserved recognition memory. *Neuroreport* 8, 1923-1928.
- Rendeiro, C., Foley, A., Lau, V.C., Ring, R., Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Williams, C.M., Regan, C., and Spencer, J.P. (2013a). A role for hippocampal PSA-NCAM and NMDA-NR2B receptor function in flavonoid-induced spatial memory improvements in young rats. *Neuropharmacology* 79C, 335-344. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.003.
- Rendeiro, C., Spencer, J.P., Vauzour, D., Butler, L.T., Ellis, J.A., and Williams, C.M. (2009). The impact of flavonoids on spatial memory in rodents: from behaviour to underlying hippocampal mechanisms. *Genes Nutr* 4, 251-270. doi: 10.1007/s12263-009-0137-2.
- Rendeiro, C., Vauzour, D., Kean, R.J., Butler, L.T., Rattray, M., Spencer, J.P., and Williams, C.M. (2012). Blueberry supplementation induces spatial memory improvements and region-specific regulation of hippocampal BDNF mRNA expression in young rats. *Psychopharmacology (Berl)* 223, 319-330. doi: 10.1007/s00213-012-2719-8.
- Rendeiro, C., Vauzour, D., Rattray, M., Waffo-Teguo, P., Merillon, J.M., Butler, L.T., Williams, C.M., and Spencer, J.P. (2013b). Dietary levels of pure flavonoids improve spatial memory performance and increase hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *PLoS One* 8, e63535. doi: 10.1371/journal.pone.0063535.
- Rick, J.T., Murphy, M.P., Ivy, G.O., and Milgram, N.W. (1996). Short intertrial intervals impair water maze performance in old Fischer 344 rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 51, B253-260.
- Rosenzweig, E.S., Rao, G., McNaughton, B.L., and Barnes, C.A. (1997). Role of temporal summation in age-related long-term potentiation-induction deficits. *Hippocampus* 7, 549-558. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:5<549::AID-HIPO10>3.0.CO;2-0.
- Ruediger, S., Spirig, D., Donato, F., and Caroni, P. (2012). Goal-oriented searching mediated by ventral hippocampus early in trial-and-error learning. *Nat Neurosci* 15, 1563-1571. doi: 10.1038/nn.3224.
- Sadowska-Bartosz, I., and Bartosz, G. (2014). Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity. *Biomed Res Int* 2014, 404680. doi: 10.1155/2014/404680.
- Schroeter, H., Bahia, P., Spencer, J.P., Sheppard, O., Rattray, M., Cadenas, E., Rice-Evans, C., and Williams, R.J. (2007). (-)Epicatchin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and up-regulates GluR2 in cortical neurons. *J Neurochem* 101, 1596-1606. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04434.x.
- Shan, Q., Lu, J., Zheng, Y., Li, J., Zhou, Z., Hu, B., Zhang, Z., Fan, S., Mao, Z., Wang, Y.J., and Ma, D. (2009). Purple sweet potato color ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage and inflammation in aging mouse brain induced by d-galactose. *J Biomed Biotechnol* 2009, 564737. doi: 10.1155/2009/564737.
- Shukitt-Hale, B., Lau, F.C., and Joseph, J.A. (2008). Berry fruit supplementation and the aging brain. *J Agric Food Chem* 56, 636-641. doi: 10.1021/jf072505f.
- Skinner, D.M., Etchegary, C.M., Ekert-Maret, E.C., Baker, C.J., Harley, C.W., Evans, J.H., and Martin, G.M. (2003). An analysis of response, direction, and place learning in an open field and T maze. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 29, 3-13.
- Smith, T.D., Adams, M.M., Gallagher, M., Morrison, J.H., and Rapp, P.R. (2000). Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *J Neurosci* 20, 6587-6593.
- Spencer, J.P. (2007). The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways. *Genes Nutr* 2, 257-273. doi: 10.1007/s12263-007-0056-z.
- Spencer, J.P. (2009). Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes Nutr* 4, 243-250. doi: 10.1007/s12263-009-0136-3.
- Sun, A.Y., Simonyi, A., and Sun, G.Y. (2002). The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Biol Med* 32, 314-318.
- Sutherland, R.J., Whishaw, I.Q., and Regehr, J.C. (1982). Cholinergic receptor blockade impairs spatial localization by use of distal cues in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 96, 563-573.

- Tan, L., Yang, H.P., Pang, W., Lu, H., Hu, Y.D., Li, J., Lu, S.J., Zhang, W.Q., and Jiang, Y.G. (2014). Cyanidin-3-O-galactoside and Blueberry Extracts Supplementation Improves Spatial Memory and Regulates Hippocampal ERK Expression in Senescence-accelerated Mice. *Biomed Environ Sci* 27, 186-196. doi: 10.3967/bes2014.007.
- Uttl, B., and Graf, P. (1993). Episodic spatial memory in adulthood. *Psychol Aging* 8, 257-273.
- Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., and Cellerino, A. (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol* 16, 296-300. doi: 10.1016/j.cub.2005.12.038.
- Van Praag, H. (2009). Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci* 32, 283-290. doi: 10.1016/j.tins.2008.12.007.
- Van Praag, H., Lucero, M.J., Yeo, G.W., Stecker, K., Heivand, N., Zhao, C., Yip, E., Afanador, M., Schroeter, H., Hammerstone, J., and Gage, F.H. (2007). Plant-derived flavanol (-)epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. *J Neurosci* 27, 5869-5878. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0914-07.2007.
- Van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., and Gage, F.H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25, 8680-8685. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1731-05.2005.
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Corona, G., Pollard, S.E., Tzounis, X., and Spencer, J.P. (2007). Champagne wine polyphenols protect primary cortical neurons against peroxynitrite-induced injury. *J Agric Food Chem* 55, 2854-2860. doi: 10.1021/jf063304z.
- White, N.M., and McDonald, R.J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem* 77, 125-184. doi: 10.1006/nlme.2001.4008.
- Wilkniss, S.M., Jones, M.G., Korol, D.L., Gold, P.E., and Manning, C.A. (1997). Age-related differences in an ecologically based study of route learning. *Psychol Aging* 12, 372-375.
- Williams, C.A., and Grayer, R.J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep* 21, 539-573. doi: 10.1039/b311404j.
- Williams, C.M., El Mohsen, M.A., Vauzour, D., Rendeiro, C., Butler, L.T., Ellis, J.A., Whiteman, M., and Spencer, J.P. (2008). Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free Radic Biol Med* 45, 295-305. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.008.
- Williams, R.J., Spencer, J.P., and Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 36, 838-849. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001.
- Witte, A.V., Kerti, L., Margulies, D.S., and Floel, A. (2014). Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. *J Neurosci* 34, 7862-7870. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0385-14.2014.
- Wolfer, D.P., and Lipp, H.P. (2000). Dissecting the behaviour of transgenic mice: is it the mutation, the genetic background, or the environment? *Exp Physiol* 85, 627-634.
- Wolff, M., Savova, M., Malleret, G., Segu, L., and Buhot, M.C. (2002). Differential learning abilities of 129T2/Sv and C57BL/6J mice as assessed in three water maze protocols. *Behav Brain Res* 136, 463-474.
- Woolf, N.J., Milov, A.M., Schweitzer, E.S., and Roghani, A. (2001). Elevation of nerve growth factor and antisense knockdown of TrkA receptor during contextual memory consolidation. *J Neurosci* 21, 1047-1055.
- Yin, H.H., and Knowlton, B.J. (2004). Contributions of striatal subregions to place and response learning. *Learn Mem* 11, 459-463. doi: 10.1101/lm.81004.



## **PARTIE III**



## **EFFET D'UNE SUPPLEMENTATION EN POLYPHENOLS SUR LE FONCTIONNEMENT CEREBRAL ET LA MEMOIRE AU COURS DU VIEILLISSEMENT : APPROCHE CLINIQUE**

Dans cette partie, le design expérimental de l'étude clinique du projet Neurophénols est présenté. Cette étude est une étude multicentrique menée en France (Nantes) et à Québec qui vise à étudier l'impact d'une supplémentation avec l'extrait Neurophenol® administré sous forme de gélules pendant 24 semaines sur la mémoire de sujets âgés. L'impact de cette supplémentation sur des marqueurs biologiques est également étudié.

### **I. Introduction**

Plusieurs études ont déjà montré que certains aliments pouvaient avoir des effets bénéfiques sur le déclin cognitif chez l'homme, et parmi les aliments étudiés on retrouve les polyphénols.

Comme déjà décrit plus haut, des études précliniques ont montré que les polyphénols peuvent entre autres jouer un rôle dans la modulation du stress oxydatif et de l'inflammation, et améliorer la signalisation neuronale et certaines fonctions métaboliques (Krikorian et al., 2012). Les données chez l'homme sont beaucoup plus rares et peu de données révèlent une efficacité des polyphénols issus de fruit sur la mémoire humaine.

De façon remarquable, une étude longitudinale portant sur 2574 sujets adultes a mis en évidence une corrélation positive et significative entre la consommation de polyphénols à mi-vie et les fonctions cognitives 13 ans plus tard (Kesse-Guyot et al., 2012). Une étude d'intervention chez l'Homme a évalué les effets du jus de raisin sur la mémoire. Cette étude randomisée en double aveugle a été réalisée chez 12 adultes âgés (moyenne d'âge : 78,2 ans) présentant un Mild Cognitif Impairment (MCI) c'est-à-dire un déclin mnésique très significatif, non diagnostiqué comme démence. Après une consommation de jus de raisin (entre 6 et 9 ml/kg de poids corporel par jour) pendant 12 semaines, une amélioration significative de la mémoire épisodique a été mise en évidence en utilisant un test d'apprentissage et de mémoire verbale adapté à cette population (le Californian Verbal Learning Test) (Krikorian et al., 2010a). Dans la continuité de cette étude aux résultats prometteurs, une autre étude a confirmé l'effet promnésiant du jus de raisin sur une durée de supplémentation plus longue, relié à une activation significative des régions antero-postérieures de l'hémisphère droit mise en évidence par IRM (Krikorian et al., 2012).



Enfin, un résultat très semblable a été obtenu par la même équipe en utilisant un protocole comparable pour aborder l'effet du jus de bleuet. Neuf hommes et femmes âgés (moyenne d'âge : 76,2 ans) présentant un déclin mnésique ont été supplémentés avec du jus de bleuet pendant 12 semaines (doses : entre 6 et 9 ml/kg de poids corporel par jour). La composition en polyphénols du jus de bleuet était de 2,38 g/l (exprimé en équivalent acide gallic). Après 12 semaines, des améliorations significatives de la mémoire épisodique ont été observées chez les sujets qui consommaient le jus de fruits (Krikorian et al., 2010b).

Ces études présentent des résultats prometteurs mais sont réalisées sur un petit nombre de sujets à chaque fois, présentant déjà des troubles significatifs de la mémoire. De plus, elles n'étudient pas de marqueurs biologiques ce qui est indispensable pour mieux comprendre les effets bénéfiques chez l'homme.

L'étude clinique du projet Neurophénols a pour but, à la fois d'étudier les effets de ce mélange d'extrait de raisins et bleuets sur différents aspects de la mémoire, mais également d'explorer des paramètres biologiques permettant d'élucider les mécanismes sous-jacents des effets fonctionnels, sélectionnés sur la base d'hypothèses élaborées à partir des données de la littérature mais également des résultats observés dans ce projet de thèse.

L'inclusion des sujets a débuté en janvier 2014 et l'étude se terminera en janvier 2015. Cette étude est une étude en double-aveugle contrôlée contre placebo, bicentrique car menée en France et à Québec.

## **II. Objectifs de l'étude**

Cette étude clinique a été développée dans le but d'étudier les effets d'un complément alimentaire contenant des extraits riches en polyphénols de *Vitis vinifera* (raisin) et *Vaccinium angustifolium* (bleuet sauvage) sur la mémoire chez des personnes âgées.

### ***II.1. Principal objectif***

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'effet du complément alimentaire riche en polyphénols sur la mémoire épisodique chez des personnes âgées.

### ***II.2. Objectifs secondaires***

Plusieurs objectifs secondaires sont également suivis notamment les effets sur différents types de mémoire, et également sur des dimensions qui permettront d'aborder

l'impact sur le bien être des sujets, à savoir la fatigue et la qualité de vie. La satisfaction ressentie suite à la consommation du produit est également mesurée.

Plusieurs objectifs exploratoires, font également l'objet de mesures: l'effet du complément alimentaire riche en polyphénols sur le métabolisme et sur l'expression de certains gènes est évalué, la biodisponibilité des polyphénols est suivie au niveau urinaire.

### **III. Design de l'étude**

Il s'agit d'une étude bicentrique, randomisée en 2 bras parallèles, en double aveugle, contrôlée contre placebo. Deux groupes de 102 volontaires sont étudiés. Un groupe consomme le produit actif Neurophenol® et l'autre consomme un placebo non discernable du verum.

#### ***III.1. Critères d'inclusion***

Pour être inclus dans l'étude les volontaires doivent satisfaire aux critères suivants :

- Sujets de sexe masculin ou féminin ;
- Agés de 60 à 70 ans (limites incluses) ;
- Autonomes, vivant à leur domicile ;
- Indice de Masse Corporelle (IMC) strictement compris entre 20 et 30 kg/m<sup>2</sup> (limites incluses);
- Consommation de fruits rouges : pas plus de 2 portions par semaine ;
- Consommation de poissons (quelle que soit l'espèce), crustacés, mollusques et algues (qu'il s'agisse de produits frais, surgelés ou en conserve, et y compris les algues consommées sous la forme de maki) : pas plus de 3 portions par semaine ;
- Score obtenu au Mini-Mental State Examination (MMSE) strictement supérieur à 26 et inférieur ou égal à 29 ;
- Sous-scores de l'échelle de mémoire logique de Wechsler (batterie destinée aux sujets de 16-69 ans) respectant les conditions suivantes :
  - score de rappel immédiat < 29;
  - score de rappel différé < 16;
- Pour les femmes ménopausées: avec ou sans Traitement Hormonal Substitutif (THS). En cas de THS en cours, celui-ci devra avoir été débuté et à doses stables depuis au moins 3 mois, et ne devra pas être modifié en cours d'étude.

- Pour le centre Français uniquement: Sujets affiliés à un système de sécurité sociale.
- Sujets capables et désireux de respecter le protocole et acceptant de donner leur consentement par écrit.

### ***III.2. Critères d'exclusion***

Les volontaires répondant à au moins l'un des critères d'exclusion suivants ne peuvent pas être inclus dans l'étude :

- Diagnostic d'un réel trouble dépressif majeur selon le module A du Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI) ;
- Consommation de complément(s) alimentaire(s) susceptible(s) d'avoir un effet sur la mémoire, et particulièrement ceux qui contiennent :
  - des polyphénols;
  - et/ ou des acides gras oméga-3 (huile de poisson, de krill ou d'algue);
  - et/ ou des multi-vitamines.

Les sujets qui consomment habituellement au moins l'un de ces compléments alimentaires mais qui acceptent de cesser de les consommer pendant toute la durée de leur participation à l'étude peuvent être inclus à condition de respecter une période de de 4 semaines sans prise de compléments avant la visite d'inclusion (V1).

- Pratique d'une activité physique intense : plus de 5 heures par semaine d'une activité physique modérée à vigoureuse.
- Régime alimentaire restrictif ou non équilibré (hypocalorique, végétarien, végétalien, ...) selon la déclaration du sujet lors de la visite V0 ;
- Diabète (de type 1 ou 2);
- Maladie cardiovasculaire diagnostiquée depuis moins de 2 ans, avec les exceptions suivantes : les sujets souffrant d'hypertension contrôlée (par traitement médicamenteux), si le ou les traitements sont stables depuis au moins 3 mois, peuvent être inclus;
- Antécédent personnel d'accident vasculaire cérébral;
- Pathologie thyroïdienne non équilibrée. Les sujets présentant une pathologie thyroïdienne équilibrée (par traitement médicamenteux) et sous traitement stable depuis au moins 3 mois peuvent être inclus;

- Traitement antidépresseur stoppé depuis moins de 3 mois ou toujours en cours;
- Antécédent personnel de schizophrénie ou d'autres troubles psychiatriques. Les antécédents de dépression sont acceptés s'ils sont résolus depuis au moins 3 mois. Les sujets ayant des antécédents de traitements occasionnels et ponctuels par benzodiazépine (pas plus de 1 dose par semaine durant les 6 derniers mois) peuvent être inclus ;
- Traitement neuroleptique en cours ;
- Trouble des fonctions visuelles ou auditives non corrigé (selon l'auto-déclaration du sujet);
- Antécédent de traumatisme crânien modéré à sévère et/ ou de chirurgie intracrânienne;
- Pathologie mettant en jeu le pronostic vital (telle que le cancer) en rémission depuis moins de 1 an ou toujours en cours ;
- Anesthésie générale dans les 6 derniers mois, ou planifiée et devant être réalisée dans les 6 prochains mois;
- Consommation d'alcool abusive : supérieure à 2 verres par jour ;
- Allergie(s) alimentaire(s) documentée(s), particulièrement à l'un des constituants des produits à l'étude ;
- Incapacité psychologique ou linguistique à signer le consentement éclairé ;
- Sous protection légale (tutelle, curatelle) ou privé de ses droits par décision administrative ou judiciaire ;
- Impossible à contacter en cas d'urgence ;
- Participation à une autre étude biomédicale en cours, ou en période d'exclusion d'une précédente étude ;
- Pour le centre Français uniquement : Ayant perçu, au cours des 12 derniers mois, des indemnités pour participation à une ou des étude(s) clinique(s) d'un montant supérieur ou égal à 4500 Euros.

### ***III.3. Produit, dose, administration et durée de supplémentation***

Le produit actif est un complément alimentaire portant le nom de Neurophenol®. Il se présente sous la forme de gélules contenant un mélange d'extraits de *Vitis vinifera* (raisin) et

de *Vaccinium angustifolium* (bleuet sauvage) riches en polyphénols. Le placebo est une gélule de même apparence et de mêmes propriétés organoleptiques que le produit testé, mais ne contenant aucun ingrédient actif. La dose, établie selon des études préliminaires ayant montrées des effets positifs, sera de 2 gélules par jour par voie orale, entre les repas (au moins une heure avant ou après un repas), avec un verre d'eau. La durée de supplémentation a été fixée à 24 semaines.

#### III.4. Conduite de l'étude

L'étude est constituée de 3 visites V0, V1 et V2 et de suivis au cours de l'étude (Figure 13).

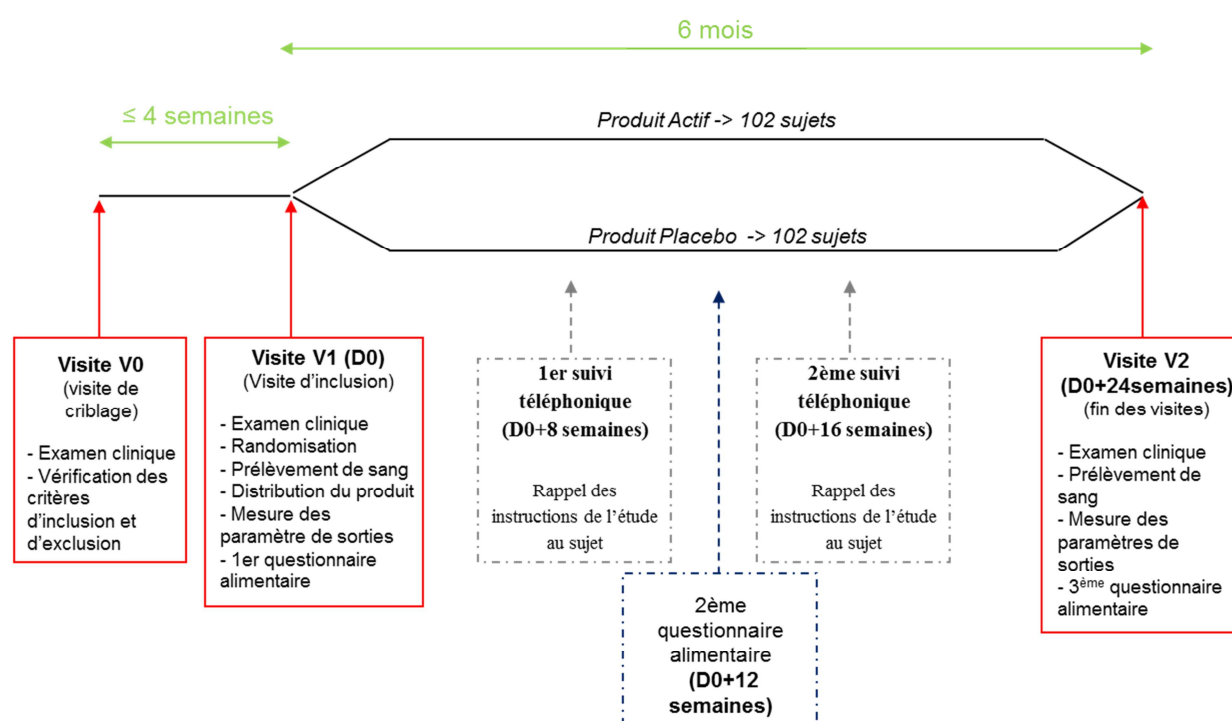


Figure 13 : Conduite de l'étude clinique

##### III.4.1. V0: Visite de pré-inclusion ( $\leq 4$ semaines avant V1)

Les sujets sont reçus au centre clinique. La procédure est décrite aux participants qui signent un formulaire de consentement. Différents paramètres sont investigués : les données démographique (ex : date de naissance), les habitudes alimentaires, physiques, et le niveau d'éducation. Un examen médical est réalisé et l'historique médical est relevé ainsi que les médicaments prescrites. Les critères d'inclusion et d'exclusion sont alors vérifiés.

Des pré-tests d'inclusion sont alors évalués :

- Le MMSE (Mini Mental State Examination) : ce test permet d'exclure les sujets présentant des signes de démence.
- Le sous-test de mémoire logique de l'échelle de mémoire de Wechler (16-69ans) : ce test permet d'exclure des sujets hypermnésiques.  
(Ces deux critères doivent permettre d'homogénéiser la population recrutée en diminuant la variabilité vis à vis des niveaux de performances de mémoires.)
- Le MINI (Mini International Neuropsychiatric Interview) (module A) : ce test permet d'exclure les sujets présentant des signes de dépression.

Des instructions sur les habitudes quotidiennes à tenir lors de l'étude sont données aux sujets. Ces recommandations incluent principalement les habitudes alimentaires.

Les sujets doivent compléter des questionnaires alimentaires au cours de l'étude qu'ils rendront à la visite V1.

#### *III.4.2. V1: visite d'inclusion (D0)*

Pour cette visite le sujet doit venir au centre clinique à jeun. A son arrivé il doit remettre son questionnaire alimentaire réalisé entre V0 et V1.

Durant cette visite un examen médical est réalisé et certains paramètres sont à nouveau vérifiés : les médications concomitantes sont relevées, les habitudes alimentaires, les critères d'inclusion et d'exclusion mais surtout la compliance des sujets vis à vis des instructions données lors de la première visite et basée sur les déclarations des sujets.

Le sujet peut alors être inclus dans l'étude et il reçoit un numéro de randomisation (RN).

Différentes procédures et analyses sont alors effectuées :

- Des prélèvements de sang à jeun (50ml en France et 24ml au Québec) en vue des analyses des paramètres biologiques.
- Un prélèvement d'urine pour analyse des quantités de polyphénols retrouvés
- Les sujets peuvent ensuite prendre un encas (sans café, thé ou cola).
- Les tests cognitifs sont alors effectués par des tests CANTAB (Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery):

- Le PAL (Paired Associate Learning)
- Le VRM (Verbal Recognition Memory)
- Le SSP (Spatial Span)
- Le Reverse Mode Spatial span

Ces tests sont issus d'une batterie de tests, le CANTAB, et sont réalisés sur tablettes numériques en présence d'un expérimentateur.

- D'autres tests sont également effectués :
  - Le GDS (Geriatric Depression Scale)
  - Le questionnaire McNair (questionnaire de plainte mnésique)
  - Un questionnaire de qualité de vie 15D
  - Un questionnaire de fatigue, le MFI-20 (Multidimensional Fatigue Inventory)
  - Le PASE (Physical Activity Scale for the Elderly)

Les sujets se voient ensuite remettre le produit à tester (gélules) pour la totalité des 6 mois d'étude. Les instructions sur les habitudes à maintenir ou éviter durant l'étude sont rappelées aux sujets. La prise du produit doit se faire entre les repas (au moins 1h avant ou après) avec de l'eau à raison de 2 gélules par prise.

#### *III.4.3. Premier suivi téléphonique (D0+8 semaines)*

Ce suivi a pour but de maintenir la motivation des sujets et de vérifier la compliance et renouveler les instructions aux sujets.

#### *III.4.4. Deuxième suivi téléphonique (D0+16 semaines)*

De même que pour le premier suivi cet appel vise à rappeler les instructions aux sujets et vérifier la compliance.

#### *III.4.5. V2: visite de fin d'étude (D0+24 semaines)*

Comme pour la première visite (V1) le sujet doit se rendre au centre clinique à jeun. A son arrivée il doit rendre le produit non utilisé et son second questionnaire alimentaire.

Différentes procédures et analyses sont alors effectuées :

- Le sujet doit consommer 2 gélules de produit à jeun.

- Des prélèvements de sang 30+/- 5 minutes après la prise du produit (50ml en France et 24ml au Québec) en vue des analyses des paramètres biologiques.
- Un prélèvement d'urine pour analyse des quantités et types de polyphénols.
- Les sujets peuvent ensuite prendre un encas (sans café, thé ou cola).
- Les tests cognitifs sont alors effectués par des tests CANTAB :
  - Le PAL (Paired Associate Learning)
  - Le VRM (Verbal Recognition Memory)
  - Le SSP (Spatial Span)
  - Le Reverse Mode Spatial span

Les tests CANTAB sont réalisés sur tablettes en présence d'un expérimentateur.

- D'autres tests seront alors effectués :
  - Le sous-test de mémoire logique de l'échelle de mémoire de Wechler (16-69ans)
  - Le MMSE (Mini Mental State Examination)
  - Le GDS (Geriatric Depression Scale)
  - Le questionnaire McNair (questionnaire de plainte mnésique)
  - Un questionnaire de qualité de vie 15D
  - Le MFI-20 (Multidimensional Fatigue Inventory)
  - Le PASE (Physical Activity Scale for the Elderly)
  - Un questionnaire de tolérance
  - Un questionnaire de satisfaction ressentie à la prise du produit

Durant cette visite un examen médical est réalisé et certains paramètres sont à nouveau vérifiés : les médications concomitantes sont relevées, les habitudes alimentaires, les critères d'inclusion et d'exclusion mais surtout la compliance des sujets vis à vis des instructions données lors de la première visite et basé sur les déclarations des sujets.

### ***III.5. Paramètres de sortie***

#### *III.5.1. Paramètre principal*

La première sortie sera le changement entre la visite V1 et la visite V2 (différence V2-V1) des erreurs effectuées sur le PAL, qui est défini par le nombre total d'erreurs par rapport au niveau de difficulté avec un ajustement en fonction du niveau atteint par le sujet. Ce



premier paramètre sera obtenu à partir du test PAL (Paired Associate Learning) (CANTAB) qui est un test d'apprentissage visuo-spatial et de mémoire épisodique.

### *III.5.2. Paramètres secondaires*

Les paramètres secondaires évalués seront les suivants:

Changements entre V1 et V2 :

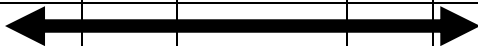
- des variables du questionnaire VRM (Verbal Recognition Memory) (CANTAB)
- des variables du test Spatial Span (SSP) (CANTAB)
- des variables du test Reverse mode Spatial Span (CANTAB)
- des variables du sous-test de mémoire logique de l'échelle de mémoire de Wechler
- du score au questionnaire McNair
- des variables du Geriatric Depression Scale (GDS) (30 items)
- du score du Mini-Mental State Examination (MMSE)
- de l'état de fatigue mesuré par le score au Multidimensional Fatigue Inventory (MFI-20)
- La satisfaction du sujet évaluée par un questionnaire lors de la visite V2.

### *III.5.3. Paramètres exploratoires: paramètres biologiques*

Différentes mesures biologiques sont mesurées suite aux différents prélèvements réalisés au cours de l'étude :

- Cholesterol total, HDL, LDL, Triglycérides (mmol/L)
- Insulinémie (mU/L)
- Glycémie (g/L)
- us-CRP (Ultra-sensitive C-Reactive Protein, mg/ L)
- Retinol Binding Protein (RBP, mg/ L) (in the French center only);
- Thyroid Stimulating Hormone (TSH,  $\mu$ UI/ mL);
- Transthyretin (TTR, g/L);
- Expression de gènes (en France seulement)
  - Expression d'interleukines pro et anti-inflammatoires
  - Expression de récepteurs nucléaires dans les cellules mononuclées du sang
  - Expression de gènes dans les cellules mononuclées du sang par une approche microarray

- Le profil des acides gras dans les membranes des érythrocytes
- Mesure des quantités de polyphénols retrouvés dans les urines et dans le plasma
- Une échantillothèque sera conservée en France pour de futures analyses, principalement sur les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear cells).

	V0	V1	1 <sup>rst</sup> call	Mid-term food diary	2 <sup>d</sup> call	V2
Delivery of the information letter and consent form	X					
Subject's information	X					
Signature of consent form (at the latest)	X					
Checking of Inclusion/Non Inclusion criteria	X	X				
Clinical Exam	X	X				X
Randomization		X				
Product Intake/consumption						
Smoking habits reporting	X	X				X
Educational reporting	X					
Logical memory subtest of the Wechsler Memory Scale	X					X
Mini-Mental State Examination (MMSE)	X					X
Module A of the Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI)	X					
CANTAB (Paired Associate Learning test (PAL), Verbal Recognition Memory (VRM), Spatial Span test (SSP), Reverse mode Spatial Span)		X				X
Geriatric Depression Scale (GDS)		X				X
McNair questionnaire		X				X
15D Quality of life questionnaire		X				X
Physical Activity Scale for the Elderly (PASE Instrument)		X				X
Multidimensional Fatigue Inventory (MFI-20)		X				X
Food diary (3-day long survey)		X		X		X
Tolerance questionnaire and satisfaction questionnaire						X

Blood samples		X				X
Urinary samples		X				X
Adverse events reporting		X				X
Concomitant medication reporting		X				X
Explanation/ Reminding study instructions	X	X	X		X	X
End of the study						X

**Tableau 3 : Design de l'étude clinique**

#### **IV. Conclusion**

Cette étude devrait nous permettre de valider les résultats obtenus sur le modèle animal de souris âgées et de mettre en évidence des effets bénéfiques du produit Neurophenol® sur le déclin mnésique lié à l'âge chez l'Homme. Les résultats obtenus devraient ainsi permettre de valoriser le produit avant de mettre en place un protocole de commercialisation. Cette étude clinique est la première à évaluer les effets d'une supplémentation en raisin et en bleuet chez l'Homme et à investiguer autant de paramètres comportementaux et biologiques. La fin des visites V2 est prévue en février 2015 et les résultats comportementaux seront analysés ensuite ainsi que les paramètres biologiques avant une levée d'aveugle. Les premiers résultats et conclusions devraient ainsi être disponibles en avril 2015.





## **DISCUSSION GENERALE**



Il est maintenant bien établi que vieillissement participe à la mise en place de déficits mnésiques. Ces altérations sont particulièrement liées à des perturbations au niveau hippocampique. D'autre part, les polyphénols ont été étudiés à plusieurs reprises et leur effet bénéfique sur la mémoire a déjà été montré. Cependant, les polyphénols représentent une grande famille de molécules et il convient de déterminer lesquels peuvent avoir des activités biologiques et un effet sur la santé. Les polyphénols de raisin et de bleuet sont des composés actifs pouvant moduler les fonctions mnésiques et notamment au cours du vieillissement. Il reste néanmoins de nombreuses inconnues quant à leurs modes d'action.

Dans ce contexte, mon travail de thèse visait à évaluer les effets d'un extrait riche en polyphénols de raisin et de bleuet sur les capacités mnésiques de souris au cours du vieillissement et de mieux comprendre leur mode d'action au niveau moléculaire et cellulaire. Ces travaux de recherche avaient également pour objectif d'apporter des arguments complémentaires pour appuyer les travaux de recherche clinique menés lors de ce projet.

Dans un premier temps, en effectuant une synthèse bibliographique de toutes les études mettant en œuvre une supplémentation en polyphénols issus de petits fruits et ciblant l'étude de leur impact sur la mémoire chez les rongeurs, nous avons proposé une formulation du mélange Neurophénol®. Cette formule mélangeant des extraits concentrés de raisin et de bleuet permet de positionner chaque catégorie de polyphénols à la concentration ayant un effet optimal dans les études déjà publiées. Le résultat de cette investigation demeure confidentiel et n'est pas décrit dans ce rapport.

Nous avons ensuite mis en œuvre une approche expérimentale permettant d'étudier les effets du vieillissement et de la consommation de ce mélange Neurophenol® sur différents types de mémoires ainsi que d'aborder ses effets sur les corrélats neurobiologiques de la mémoire.

Ainsi, nous avons mis au point un modèle nutritionnel permettant une supplémentation en Neurophénol® à partir de la mi-vie, période pendant laquelle le déclin cognitif est le plus actif. Ce modèle devait nous permettre, à la fois d'objectiver le déficit de mémoire lié à l'âge, tout en situant l'intervention nutritionnelle à un âge où l'amplitude des déficits mnésiques est encore récupérable. Sur ce modèle, nous avons abordé plusieurs paradigmes comportementaux, permettant d'étudier plusieurs types de mémoire ciblant préférentiellement l'hippocampe, afin de préciser l'efficacité de ce mélange concentré en polyphénols extraits



de raisin et de bleuets sur la prévention de déficits de mémoire liés au vieillissement et sur les processus neurobiologiques sous jacents.

Sur ce modèle, nous avons également mené une observation plus systémique de l'effet de la consommation de polyphénols sur la durée de vie des animaux. Enfin, en collaboration avec des chercheurs de l'université Laval nous avons pu aborder certains aspects de la biodisponibilité au niveau plasmatique et cérébral de composés phénoliques présents dans le mélange.

En parallèle de ces travaux chez l'animal nous avons également mis au point le protocole d'étude clinique visant à tester l'effet d'une supplémentation en Neurophenol® sur le déclin cognitif chez la personne âgée. Ce protocole est actuellement en cours de réalisation.

## **I. Résumé des principaux résultats**

### ***1.1. Première étude : Effet d'une supplémentation en polyphénols sur l'apprentissage et la mémoire et la neurogenèse adulte hippocampique au cours du vieillissement.***

Dans cette première étude nous avons mis en place un modèle nous permettant de mettre en évidence l'impact du vieillissement sur la mémoire afin d'étudier l'efficacité de la consommation d'un régime enrichi en Neurophénol® chez la souris sur les processus mnésiques. Nous avons ainsi évalué les capacités d'apprentissage et de mémoire de souris âgées et supplémentées en polyphénols pendant 14 semaines en utilisant plusieurs paradigmes comportementaux ciblant la mémoire à long terme et à court terme. Nous nous sommes également intéressés aux conséquences du vieillissement et d'une supplémentation en polyphénols sur la neurogenèse adulte hippocampique et l'expression de gènes impliqués dans la plasticité l'hippocampique. Enfin, nous avons évalué l'effet de cette supplémentation sur l'espérance de vie. Nous avons également mesuré la quantité de polyphénols présents au niveau plasmatique et cérébral suite à cette supplémentation en Neurophénol®.

Nos résultats ont montré qu'une consommation chronique de polyphénols de raisin et de bleuet, pendant 14 semaines dans la deuxième partie de la vie, permettait de rétablir les capacités d'apprentissage spatial en piscine de Morris et la mémoire de reconnaissance d'objet altérées par le vieillissement chez la souris. Nous n'avons pas mis en évidence de comportement de type anxieux chez les animaux âgés, ou en lien avec la consommation de

polyphénols. De façon intéressante, nous avons montré que l'extrait Neurophénol® permettait d'augmenter la proportion de neurones immatures présentant des prolongements dendritiques chez les souris âgées. De plus, nos résultats ont montré que la consommation de polyphénols induisait une augmentation de l'expression de NGF hippocampique mais pas de BDNF chez les animaux adultes et âgés. Nous avons également observé que la mortalité était très diminuée chez les souris âgées consommant les polyphénols. Enfin, certains polyphénols ou leurs métabolites ont été retrouvés au niveau plasmatique ainsi qu'au niveau cérébral.

Cette première étude a permis de montrer l'efficacité du mélange Neurophénol® sur les altérations de l'apprentissage et de la mémoire dépendants de l'hippocampe, mises en place au cours du vieillissement, ainsi que sur les processus de plasticité neuronales telle que la neurogenèse hippocampique. Elle suggère de plus que ces effets cérébraux pourraient procéder d'une action directe des composés ingérés présents dans le mélange ou de leurs métabolites.

Enfin nos résultats montrent que l'effet « anti-vieillesse » de ce mélange de polyphénols extraits de fruits ne se limite pas au cerveau puisque sa consommation chronique a un impact systémique se traduisant par une augmentation de la durée de vie.

### ***1.2. Deuxième étude : Effet d'une supplémentation en polyphénols sur l'apprentissage spatial au cours du vieillissement.***

Dans cette deuxième étude, nous avons abordé l'étude approfondie de l'impact de l'âge puis de la consommation de polyphénols sur les capacités d'apprentissage spatial dans le labyrinthe aquatique de Morris. Pour cela nous avons analysé les stratégies de recherche de la plateforme immergée mises en oeuvre par les souris pendant la période d'apprentissage spatial en piscine. Nous avons également étudié l'impact du vieillissement et de la consommation de polyphénols sur l'expression de gènes au niveau hippocampique, afin de déterminer les mécanismes neurobiologiques pouvant expliquer les observations comportementales.

Comme dans la précédente étude, les résultats de cette étude montrent que le vieillissement altère significativement les capacités d'apprentissage spatial. La consommation de polyphénols pendant 8 semaines rétablit les capacités d'apprentissage chez les souris âgées. Cette consommation semble également avoir un effet positif, bien que de moindre

amplitude, sur les performances d'apprentissage des souris adultes. Dans cette étude, notre intérêt s'est porté sur les stratégies utilisées par les souris pour réaliser la tâche d'apprentissage. En effet, dans le test utilisé, le labyrinthe aquatique de Morris, les animaux peuvent utiliser des stratégies de type spatial, qui implique une utilisation de l'hippocampe, ou non spatial afin de rejoindre la plateforme immergée. Nos résultats ont montré que les souris utilisaient dans un premier temps majoritairement des stratégies de type non spatial puis, mettaient en œuvre, progressivement, au fur et à mesure de l'apprentissage, de plus en plus de stratégies de type spatial. Cependant, les souris âgées utilisaient d'emblée beaucoup moins de stratégies de type spatial que les souris adultes et cette différence se maintenait tout au long de l'apprentissage. De manière intéressante, les souris recevant des polyphénols avaient recours dès le premier jour d'apprentissage à plus de stratégies spatiales que les souris sous régime contrôle. Ces résultats suggèrent que le vieillissement induit des altérations de l'hippocampe qui se traduisent, par une diminution des possibilités d'utiliser des stratégies spatiales, plus sophistiquées et efficaces dans ce test, et que les polyphénols consommés améliorent la fonction hippocampique et corrigent les effets du vieillissement.

Par ailleurs, les résultats obtenus en biologie moléculaire ont montré que le vieillissement et l'extrait Neurophenol® pouvaient moduler l'expression de gènes au niveau de l'hippocampe, impliqués dans les fonctions mnésiques. En effet, nous avons montré que les souris âgées présentaient une diminution d'expression hippocampique de CaMKII et que cette expression était rétablie par la consommation de polyphénols. De plus, nous avons montré que les polyphénols consommés pendant 8 semaines augmentaient l'expression hippocampique de NGF chez les souris adultes ainsi que chez les souris âgées ce qui pourrait contribuer à expliquer les résultats comportementaux. Contrairement à ce qui avait déjà été montré dans d'autres études nous n'avons observé aucune modification d'expression hippocampique de BDNF, Akt ou ERK1/2 par les polyphénols.

Cette deuxième étude confirme l'efficacité de la consommation de Neurophenol® sur les déficits liés à l'âge chez la souris. Cet effet promnésiant a également été observé chez les souris adultes. De plus, cette étude propose une nouvelle procédure d'analyse qualitative des observations comportementales qui permet ici de mettre en évidence des déficits d'apprentissage hippocampo-dépendants au cours du vieillissement ainsi que l'effet bénéfique des polyphénols pour prévenir ou corriger ces déficits.

## **II. Effet des polyphénols sur l'apprentissage et la mémoire au cours du vieillissement**

### ***II.1. Effet du vieillissement et des polyphénols sur l'apprentissage spatial en piscine de Morris***

#### *II.1.1. Déficits d'apprentissage liés au vieillissement*

En accord avec les précédentes études sur des animaux âgés (Lindner, 1997; Wolff et al., 2002; de Fiebre et al., 2006) nos résultats montrent des déficits d'apprentissage liés à l'âge mis en évidence dans le labyrinthe aquatique de Morris. Des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale liés à l'âge ont été rapportés chez différentes espèces et notamment chez des humains, des singes et des rats et des souris âgés (Barnes, 1979; Markowska et al., 1989; Uttl and Graf, 1993; Lai et al., 1995; Gallagher and Rapp, 1997; Rapp et al., 1997; Wilkniss et al., 1997; Bach et al., 1999; Gazova et al., 2013). L'hippocampe joue un rôle majeur dans l'élaboration de cette mémoire et les dommages hippocampiques sont responsables des altérations de la mémoire spatiale (O'Keefe et al., 1975; Morris et al., 1982; Moser et al., 1995; Vargha-Khadem et al., 1997; Teng and Squire, 1999; de Hoz et al., 2005). L'hippocampe étant une structure connue pour être particulièrement vulnérable au cours du vieillissement, nous avons ciblé notre travail sur l'étude de la mémoire spatiale et de l'effet du mélange de polyphénols sur la récupération de cette mémoire. L'utilisation du labyrinthe aquatique de Morris devait nous permettre d'évaluer l'apprentissage et la mémoire spatiale. Ce test est souvent utilisé pour évaluer les processus d'apprentissage et de mémoire dépendants de l'hippocampe chez les rongeurs (Morris et al., 1982; Morris, 1984; D'Hooge and De Deyn, 2001). De plus, les performances dans le labyrinthe aquatique sont particulièrement sensibles aux déficits liés à l'âge (Lindner, 1997; Wolff et al., 2002; de Fiebre et al., 2006).

Les résultats obtenus dans nos deux études ont montré que les souris âgées présentaient des déficits d'apprentissage spatial. Ceux-ci se traduisent par le fait que les souris âgées parcourent lors de la période d'apprentissage, une distance plus importante que les adultes pour rejoindre la plateforme. Néanmoins, cette distance diminue quand même au fur et à mesure de cet apprentissage suggérant que les capacités d'apprentissage sont préservées bien que ralenties par le vieillissement.

De plus, le test de rétention effectué lors des deux études ne nous a pas permis de mettre en évidence des déficits de rétention de mémoire spatiale. Ceci peut s'expliquer de

deux manières. Soit nos souris ne sont pas aussi âgées que celles testées lors d'un probe test dans certaines études mettant en évidence ces déficits de rétention lié à l'âge (de Fiebre et al., 2006) ; soit, les souris ayant correctement réussi à apprendre la position de la plateforme à la fin de l'acquisition, les délais de 48h et 72h sont trop courts pour nous permettre d'observer des déficits de mémorisation. Des résultats similaires aux nôtres, à savoir la mise en évidence de déficits d'apprentissage liés à l'âge sans déficits de rétention de mémoire spatiale lors du probe test, ont été décrits (van Praag et al., 2005).

### *II.1.2. Effets des polyphénols sur les performances d'apprentissage*

Les effets bénéfiques des polyphénols apparaissent clairement dans nos deux études, avec les deux durées d'exposition aux polyphénols testées. Lorsque la durée de l'exposition est de 6 semaines avant le début du test, les polyphénols ont un effet bénéfique sur les capacités d'apprentissage des souris alors âgées de 17,5 mois et nous avons également montré un effet bénéfique sur l'apprentissage des souris adultes avec une différence observable principalement lors du premier jour d'apprentissage. Lorsque la consommation de polyphénols est plus longue, à savoir une consommation de 13 semaines avant le test de piscine, elle permet également de corriger les déficits d'apprentissage des souris âgées contrôles. En revanche, ce deuxième protocole ne nous a pas permis d'observer d'effet des polyphénols chez les souris adultes. Ceci peut s'expliquer par une différence de protocole. En effet, dans le premier cas, les souris étaient placées sur la plateforme pendant 30 secondes avant le premier essai d'apprentissage et pas dans l'autre cas. La recherche de la plateforme lors du premier essai en est donc possiblement améliorée et on peut supposer que les souris aient eu recours à leur mémoire de travail. Il serait intéressant, de réaliser des tests de mémoire spatiale de travail afin de déterminer si cette hypothèse est valable. Un autre point diffère également entre les deux études qui pourrait potentiellement expliquer les différences de résultats obtenus. En effet, les souris exposées à la durée de supplémentation la plus longue, (première étude) ont été soumises à plusieurs autres tests comportementaux avant le test du labyrinthe aquatique. On peut supposer que ces tests préalables aient influencé les paramètres de stress en stimulant l'axe corticotrope et il est connu que de telles modifications de l'axe corticotrope peuvent influencer les capacités d'apprentissage et de mémoire (Issa et al., 1990; Yau et al., 1995; Lupien et al., 1998).

Cependant, nous avons montré *via* le test du labyrinthe en croix surélevé que la consommation de polyphénols, en elle-même, ne modifiaient pas l'anxiété des animaux. D'un

autre côté, les tests qui ont précédé le passage dans la piscine, ont également pu agir comme des exercices cérébraux et ainsi amoindrir les différences déjà faibles observées entre souris adultes et souris adultes supplémentées. Il faut noter que de façon intéressante, si cette stimulation cérébrale existe, ce « pré-entraînement » ne permet pas de corriger les performances des souris âgées.

Les effets de polyphénols sur l'apprentissage et la mémoire spatiale évalués dans le labyrinthe aquatique de Morris ont déjà été montré dans plusieurs conditions expérimentales (Joseph et al., 1999; van Praag et al., 2007; Li et al., 2009a; Harada et al., 2011; Tan et al., 2014).

Considérant cet effet des polyphénols sur les capacités d'apprentissage spatial des souris âgées, sachant aussi que l'hippocampe est nécessaire à l'apprentissage spatial et que l'âge altère l'intégrité de cette structure, nous pouvons suggérer que les polyphénols permettraient d'agir au niveau de l'hippocampe pour établir leurs effets sur la mémoire.

### *II.1.3. Stratégies d'apprentissage en labyrinthe aquatique de Morris*

Le paradigme que nous avons mis en œuvre dans le labyrinthe aquatique de Morris permet d'évaluer l'apprentissage et la mémoire spatiale (Morris et al., 1982; Morris, 1984) mais il se peut que ce ne soit pas toujours strictement le cas. En effet, dans certaines situations, les performances réalisées par les souris peuvent impliquer d'autres stratégies de recherche pour rejoindre la plateforme. Un examen des stratégies mises en œuvre a déjà été utilisé pour analyser les performances de rats (Graziano et al., 2003), de souris transgéniques (Wolfer and Lipp, 2000; Grootendorst et al., 2001; Lang et al., 2003; Janus, 2004) ou même dans des modèles de lésions cérébrales (Sutherland et al., 1982; Surh et al., 1999; Brody and Holtzman, 2006).

Il a été défini que pour la navigation spatiale, les rongeurs peuvent utiliser deux types de stratégies durant l'apprentissage : allocentriques ou égocentriques. Les stratégies allocentriques se basent sur les informations spatiales afin d'établir une cartographie spatiale du contexte expérimental (Cain et al., 1997, Matthews and Best, 1997 and Chapillon, 1999). Les animaux doivent donc utiliser les indices spatiaux afin de retrouver la plateforme. Ces stratégies ont été qualifiées de spatiales dans nos analyses. D'un autre côté, les informations égocentriques se basent sur la position du corps dans l'espace et ne requièrent pas l'utilisation d'informations spatiales. Dans ce cas, l'animal rejoint la plateforme en répétant une série de

mouvements appris. De ce point de vue nous avons classifié ce type de stratégies comme étant non-spatiales. La difficulté de classifier les stratégies vient du fait que certaines d'entre elles sont ambiguës ou ne remplissent pas tous les critères de classifications. Ainsi nous avons catégorisé comme stratégies spatiales les parcours réalisés par les souris nécessitant l'utilisation d'indices spatiaux et permettant de rejoindre la plateforme (point de recherche correct). En tant que stratégies non-spatiales, nous avons classé les stratégies ne nécessitant pas l'utilisation d'indices spatiaux, basées sur une recherche aléatoire de l'objectif ou de type égocentrique relevant de l'utilisation de mouvements répétés (comme la stratégie « chaining » où la souris tourne à une distance précise du mur pour trouver la plateforme), mais également les stratégies résultant d'une mauvaise utilisation des indices (ex : stratégie « focal incorrect »). Nous avons ainsi repertorié et classifié les stratégies de recherche utilisées lors de chaque essai d'apprentissage pour chaque souris en nous basant sur une version modifiée de la catégorisation des stratégies proposée par (Janus, 2004; Brody and Holtzman, 2006) et (Ruediger et al., 2012).

Chez les rongeurs il a été montré que la navigation allocentrique (ou apprentissage spatial) était dépendante de l'hippocampe alors que la navigation égocentrique (ou de réponse) dépendait du striatum dorsal (Morris et al., 1982, O'Keefe and Nadel, 1978, Packard and Knowlton, 2002 and White and McDonald, 2002).

De façon cohérente avec des études précédentes (Morris, 1984; Wolfer and Lipp, 2000; Janus, 2004; Ruediger et al., 2012), notre analyse détaillée des stratégies de recherche a montré que les souris utilisent différentes stratégies au cours de l'apprentissage. En effet, les souris ont utilisé d'abord des stratégies non-spatiales, de recherche globale (au hasard) puis plus locales (scanning) ou de mouvements appris (chaining). Plus tard dans les essais sont apparues les stratégies spatiales. De plus, nous avons observé que le recours à des stratégies spatiales augmentait de façon continue avec la diminution de la distance moyenne empruntée pour rejoindre la plateforme suggérant une meilleure efficacité des stratégies spatiales pour résoudre la tâche comportementale.

Nous avons montré que les déficits observés chez les animaux âgés pouvaient être lié à une perturbation de l'apprentissage spatial et plus particulièrement à une évolution plus lente vers l'utilisation de stratégies spatiales. En effet, nous avons observé que les souris âgées utilisaient globalement moins de stratégies spatiales en comparaison avec les souris adultes. De plus, il semblerait que les souris âgées nécessitent plus d'essais pour passer à l'utilisation

de stratégies spatiales. Ainsi les distances plus longues pour rejoindre la plateforme pendant l'apprentissage pourraient être dues à une recherche au hasard dans la piscine, qui pourrait indiquer un manque de capacités d'apprentissage spatial, ou à la persistance de l'utilisation de stratégies moins efficaces qu'une stratégie spatiale. En effet, de façon intéressante, l'adoption d'une stratégie moins efficace, comme une stratégie systématique (ex : chaining), mais conduisant à découvrir la plateforme peut permettre à des souris présentant des déficits, d'apprendre, mais avec une moindre efficacité, *via* l'utilisation d'une solution alternative. Comme indiqué précédemment l'utilisation de stratégies spatiales (ou allocentriques) dépendent de l'hippocampe, ainsi ces résultats montrant une diminution de l'utilisation de ces stratégies chez les souris âgées suggèrent fortement la présence d'altérations hippocampiques liées à l'âge.

Notre étude a montré pour la première fois qu'une supplémentation nutritionnelle et plus particulièrement avec des polyphénols pouvait moduler cette évolution de l'apprentissage spatial en augmentant quantitativement l'utilisation de stratégies spatiales chez les souris âgées mais également chez les souris adultes.

Grâce à cette analyse nous pouvons conclure que l'intégrité de l'hippocampe, nécessaire à l'apprentissage spatial et à l'établissement des stratégies spatiales, est altérée par le vieillissement et que les polyphénols de raisin et de bleuet peuvent agir sur les fonctions hippocampiques pour rétablir les capacités d'apprentissage chez les animaux âgés.

## ***II.2. Effet du vieillissement et des polyphénols sur la mémoire de reconnaissance***

### *II.2.1. Déficiences de mémoire de reconnaissance liés au vieillissement*

Le test de mémoire de reconnaissance d'un nouvel objet a d'abord été développé pour les rats (Ennaceur and Delacour, 1988), puis adapté plus tard pour les souris avec quelques modifications (Dodart et al., 1997; Messier, 1997; Steckler et al., 1999). Ce test a été utilisé dans des études lésionnelles et de pharmacologie mais aussi dans des modèles de vieillissement. Le test de reconnaissance d'objet a l'avantage de permettre de tester la reconnaissance d'objet jusqu'à une échelle de mémoire à long terme (plus de 24h). Bien que les bases anatomiques des processus sous-tendant la mémoire de reconnaissance ne soient pas encore totalement déterminées, certaines études ont déjà caractérisé l'importance de l'hippocampe dans les processus de reconnaissance et de familiarité (Mumby, 2001; Buffalo



et al., 2006; Rossato et al., 2007; Squire et al., 2007). Le rôle de l'hippocampe dans le test de reconnaissance d'objet a été étudié par différentes méthodes (Dere et al., 2007). Il a été montré que des rats avec des lésions hippocampiques présentaient des déficits de reconnaissance à des délais de 10min, 1 et 24h (Clark et al., 2000). Une autre étude sur des souris C57Bl/6 a montré qu'une inactivation temporaire de l'activité neuronale dans l'hippocampe dorsal par infusions de lidocaïne altérait la reconnaissance d'un nouvel objet après un délai de 24h mais pas de 5min (Hammond et al., 2004). L'hippocampe étant particulièrement altéré par le vieillissement, la mémoire de reconnaissance devrait alors être altérée également. Il existe peu de données sur les déficits de mémoire chez la souris comparé aux données disponibles chez le rat. Il a été montré que des souris âgées pouvaient discriminer un nouvel objet d'un familier dans un intervalle de mémoire de travail mais pas lorsque le délai était étendu à 24h (Fahlstrom et al., 2011). Cet effet a été montré par un test d'évitement passif, montrant des performances intactes en mémoire de travail et des déficits de rétention avec de plus longs délais chez des souris C57Bl/6J âgées de 24 mois (Dean et al., 1981).

Pour notre étude nous avons utilisé le test de reconnaissance d'objet afin de tester la mémoire à long terme (Bevins and Besheer, 2006). Pour cela nous avons utilisé un délai de 24h entre la phase d'acquisition et la phase de rappel. Nos résultats ont montré que les souris âgées présentaient des déficits de mémoire en comparaison aux souris adultes contrôles. En effet, les souris âgées ne discriminent pas les deux différents objets lors de la phase de rappel, indiquant qu'elles ont oublié l'objet déjà exploré. Ce test mettant en jeu l'hippocampe, nous pouvons suggérer que l'hippocampe des souris est altéré par le vieillissement.

### *II.2.2. Effets des polyphénols sur la mémoire de reconnaissance*

Les effets bénéfiques des polyphénols sur la reconnaissance d'objet chez des rongeurs présentant des déficits dans ce test ont déjà été rapportés. Les proanthocyanidines, un type de polyphénols présent dans l'extrait que nous avons testé, peuvent rétablir les performances de mémoire de reconnaissance d'objet chez un modèle de senescence accélérée chez la souris (SAMP8) présentant des déficits de mémoire (Yokozawa, 2011). Une administration de curcumin améliore les capacités de mémoire de reconnaissance d'un nouvel objet de souris âgées (Yu et al., 2013). Une supplémentation en bleuet chez des souris recevant un régime hyperlipidique permet également de rétablir les performances de mémoire de reconnaissance altérées par ce régime. Cet effet bénéfique n'a été observé qu'après 4 mois de supplémentation (pas d'effet après 2 mois et 3 mois) (Carey et al., 2014).

Dans notre étude nous montrons que la supplémentation en polyphénols de raisin et de bleuet pendant 14 semaines permet de prévenir les déficits observés chez les souris âgées. En effet, les souris âgées supplémentées en Neurophenol® reconnaissent le nouvel objet après 24h de la même façon que les souris adultes contrairement aux souris âgées sous régime contrôle qui ne discriminent pas les deux objets.

Ces résultats appuient à nouveau l'hypothèse selon laquelle les polyphénols pourraient agir sur les fonctions hippocampiques altérées au cours du vieillissement et permettre une meilleure activité hippocampique.

### **III. Effet des polyphénols sur la plasticité cérébrale au cours du vieillissement**

La plasticité cérébrale est définie comme l'ensemble des modifications durables de la constitution de réseaux neuronaux permettant de traiter l'information nécessaire aux processus d'apprentissage et de mémoire. La plasticité cérébrale inclut ainsi à la fois la plasticité synaptique et la neurogenèse. La plasticité synaptique est la capacité des neurones à modifier leurs propriétés (morphologiques, chimiques et fonctionnelles) au cours du temps. L'hippocampe a été décrit comme étant le siège de phénomènes de plasticité synaptique, notamment car celui-ci est une structure clé dans les processus d'apprentissage (Morris, et al. 2006). La neurogenèse quant à elle est l'ensemble des processus conduisant à l'intégration fonctionnelle de nouveaux neurones dans les circuits cérébraux. Un des principaux sièges de la neurogenèse adulte est l'hippocampe.

Nous nous sommes ainsi intéressés aux modifications de plasticité cérébrale et plus particulièrement de l'expression de gènes impliqués dans cette plasticité et de la neurogenèse adulte induites par le vieillissement et les polyphénols. Nous nous sommes focalisés sur l'hippocampe car comme dit précédemment, cette structure est impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Ces informations nous ont permis de faire le lien entre les résultats comportementaux et des mécanismes neurobiologiques sous jacents.

#### ***III.1. Effet du vieillissement et des polyphénols sur l'expression génique***

Il a été démontré que la mémoire à court terme et la mémoire à long terme sont médiées par des changements au niveau moléculaire (Carew, 1996; Kandel, 2001; Sossin, 2008). Pour la mémoire à long terme, la synthèse de nouveaux ARNm et de protéines est requise (Martin et al., 2000; Kelleher et al., 2004; Bramham and Wells, 2007). Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans le contrôle de la synthèse de nouvelles protéines comme

la voie de la kinase ERK (Sweatt, 2001; 2004), qui convergent vers le facteur de transcription CREB. Ce dernier se lie aux régions promotrices de plusieurs gènes associés à la plasticité synaptique (Harris and Kater, 1994; Impey et al., 2004; Barco et al., 2006; Alvarez and Sabatini, 2007). L'activation de CREB en aval de ERK apparait cruciale pour l'induction de changements durables de la plasticité synaptique et de la mémoire (Impey et al., 1996; Impey et al., 1998; Pham et al., 1999).

Les dysfonctionnements de l'hippocampe au cours du vieillissement pourraient être dus à une persistance et une magnitude réduites de la PLT des synapses hippocampiques corrélés à un oubli plus rapide des informations spatiales (Barnes, 1979; Barnes and McNaughton, 1985; Deupree et al., 1991; Barnes et al., 1992; Moore et al., 1993; Geinisman et al., 1995; Rosenzweig et al., 1997; Calhoun et al., 1998; Smith et al., 2000). Les polyphénols semblent pouvoir avoir un impact sur les différentes voies de signalisations neuronales impliquées dans la plasticité synaptique et la PLT (Williams and Grayer, 2004; Schroeter et al., 2007; Spencer, 2007; Vauzour et al., 2007; Rendeiro et al., 2009).

Dans nos études nous nous sommes intéressés à l'expression de différents gènes liés à ce facteur de transcription CREB pouvant moduler la plasticité synaptique à long terme. Nous avons ainsi étudié l'expression des kinases ERK, Akt, CaMKII, et des neurotrophines BDNF et NGF.

### *III.1.1. Expression des kinases ERK, Akt, CaMKII*

#### **ERK**

Des études ont montré que l'âge et les polyphénols pouvaient moduler l'expression de ERK. Il a été montré que chez des rats âgés de 21 mois, les niveaux hippocampiques de phospho-ERK1 et phospho-ERK2 étaient significativement réduits en comparaison à des rats plus jeunes (9 mois). Après exposition de rats âgés à un régime enrichi en bleuet pendant 12 semaines, il a été montré que les niveaux de ERK1/2 actifs étaient significativement plus haut que ceux des animaux âgés contrôles. En revanche, les niveaux d'expression protéique de ERK1/2 total n'étaient pas modifiés ni par l'âge ni par les fruits (Williams et al., 2008). L'augmentation de l'activation de ERK1 et ERK2 a également été observée chez des rats âgés de 8 semaines supplémentés en flavonoïdes de bleuet pendant 3 semaines (Rendeiro et al., 2013a).

Contrairement à ce qui aurait pu être attendu nous n'avons pas observé de diminution de l'expression génique de ERK chez les animaux âgés. Au contraire, nous avons même observé une augmentation d'expression de ERK1 chez les souris âgées. La supplémentation en polyphénols n'a pas permis de moduler l'expression de ERK1 ou ERK2. Il faut noter que nous avons étudié l'expression de leurs ARNm dans l'hippocampe, alors que les précédentes études portant sur l'effet des polyphénols ont étudié leur expression et leur activation protéiques. Dans ces études, l'activation protéique par phosphorylation était le seul paramètre modulé par les polyphénols, il semble donc cohérent avec ces précédents résultats que nous n'ayons pas observé de modification de l'expression des ARNm après supplémentation en polyphénols.

### Akt

De même que pour ERK, il semble que l'activation hippocampique de Akt diminue avec le vieillissement et puisse être augmentée par les polyphénols. En effet, il a été montré qu'une consommation de polyphénols de bleuet permettait de rétablir le niveau de phosphorylation de Akt chez des rats âgés (Williams et al., 2008). De plus, les flavonoïdes de bleuet permettraient également d'augmenter l'activation de Akt chez des rats adultes (Rendeiro et al., 2013a).

Dans cette étude, nous n'avons pas observé de modifications d'expression des ARNm de Akt au niveau hippocampique mais, comme pour ERK, ce résultat reste cohérent avec ceux des études précédentes qui n'ont étudié que l'activation protéique de Akt.

L'impact des polyphénols sur ERK et Akt semble donc limité à l'activation par phosphorylation, impliquant potentiellement d'autres kinases telle que la PKA (Li et al., 2009a), mais cet effet n'est pas unanime (Williams et al., 2008).

### CamKII

Il a été montré que les niveaux hippocampiques de CaMKII phosphorylée, capable de réguler la phosphorylation de CREB (Wei et al., 2002), étaient diminués chez l'animal âgé en comparaison avec des animaux adultes. Une supplémentation en bleuet chez le rat âgé ne permettait pas de rétablir l'état de phosphorylation de cette kinase (Wei et al., 2002). A l'inverse une supplémentation avec des catéchines de thé vert était efficace pour rétablir les niveaux d'expression hippocampique de la protéine CaMKII diminués chez des souris âgées (Li et al., 2009a) ou des souris à vieillissement accéléré (SAMP8) (Li et al., 2009b).

Dans notre étude, nous avons montré que l'expression hippocampique des ARNm de CaMKII était diminuée chez les souris âgées et que la consommation de polyphénols de raisin et de bleuet permettait de rétablir les niveaux d'expression chez les souris âgées supplémentées. Au vue des résultats précédemment cités, nous pouvons suggérer que l'effet des polyphénols serait du à la présence de flavanols dans l'extrait utilisé. Ces derniers agiraient sur l'expression des ARNm de CaMKII au niveau de l'hippocampe, ce qui pourrait conduire à une diminution de l'expression protéique de CaMKII.

### *III.1.2. Neurotrophines*

La voie de signalisation de CREB est aussi impliquée dans la transcription de neurotrophines comme BDNF ou NGF, impliquées dans la survie, la croissance et la différenciation neuronale (Finkbeiner et al., 1997; Finkbeiner, 2000; Schinder and Poo, 2000; Conkright et al., 2003; Pruunsild et al., 2011). Les facteurs neurotrophiques induisent aussi la différenciation des cellules progénitrices en neurones, ce processus constitue la neurogenèse (Pham et al., 2002; Barnabe-Heider and Miller, 2003; Nguyen et al., 2009). BDNF et NGF jouent un rôle crucial dans la survie et le développement des neurones périphériques et cérébraux (Allen and Dawbarn, 2006; Chao et al., 2006).

#### **BDNF**

La régulation de BDNF est importante car cette neurotrophine est liée au contrôle de la plasticité synaptique et de la mémoire à long terme (Poo, 2001; Bramham and Messaoudi, 2005; Calabrese et al., 2009). De plus, une diminution de l'expression des ARNm et des protéines BDNF et pro-BDNF a été rapportée au cours du vieillissement et également dans le cas de la maladie d'Alzheimer (Phillips et al., 1991; Michalski and Fahnstock, 2003; Peng et al., 2005; Calabrese et al., 2013).

Plusieurs études ont montré que les polyphénols pouvaient moduler l'expression de BDNF. Une supplémentation en catéchines de thé vert permet en effet de rétablir les niveaux d'expression protéique de BDNF dans l'hippocampe chez des souris âgées (Li et al., 2009a). Chez le rat âgé une supplémentation en bleuet permettait de rétablir les niveaux d'expression hippocampique de pro-BDNF et de BDNF diminués chez les animaux âgés (Williams et al., 2008). En revanche, deux études ont montré que pro-BDNF n'était pas modulé par une supplémentation en polyphénols ce qui suggère que les conditions d'expérimentation jouent un rôle important dans la régulation de cette protéine ou dans sa mise en évidence (Rendeiro

et al., 2013a; Rendeiro et al., 2013b). Néanmoins, une supplémentation en bleuet, en flavanols ou en anthocyanes chez le rat âgé permet d'augmenter les niveaux de BDNF hippocampique diminué avec l'âge (Rendeiro et al., 2013b). L'analyse menée par ces auteurs a également révélé que seule la supplémentation avec des anthocyanes permettait d'augmenter de façon significative l'expression des ARNm de BDNF dans les régions de l'hippocampe (Rendeiro et al., 2013b). Une supplémentation en flavonoïdes de bleuet permet aussi d'augmenter les niveaux d'expression protéique de BDNF mature dans l'hippocampe de rat adulte (8 semaines) (Rendeiro et al., 2013a). C'est également le cas de polyphénols d'olives, efficaces pour augmenter l'expression protéique de BDNF dans l'hippocampe de souris (De Nicolo et al., 2013). Concernant le récepteur au BDNF, TrkB, les polyphénols d'olive ou de bleuet ne semblent pas modifier son expression protéique ni son activation (De Nicolo et al., 2013; Rendeiro et al., 2013a).

Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas observé de modification d'expression hippocampique des ARNm de BDNF ni par le vieillissement ni par l'exposition aux polyphénols. Les niveaux de BDNF ne sont pas constants durant la période post-natale (Bath et al., 2013). Le sens de la régulation de l'expression de BDNF semble être dépendant de la région cérébrale considérée (De Nicolo et al., 2013). En effet, BDNF augmentait dans l'hippocampe de souris en conditions de vieillissement normal, mais pas en conditions de vieillissement accompagné d'altérations pathologiques (Kato-Semba et al., 1998). En revanche, une diminution des niveaux hippocampique de BDNF chez le rat âgé en comparaison avec des rats jeunes adultes a été observée (Karege et al., 2002). De plus, l'activité physique pouvait moduler l'expression hippocampique de BDNF (Gomez-Pinilla 2013).

Dans la présente étude, nous avons mesuré l'expression des ARNm de BDNF après une semaine (au moins) de tests comportementaux qui exposaient les animaux à une activité physique quotidienne pendant plusieurs jours, en particulier dans la piscine où les animaux doivent nager. On peut supposer que cet exercice physique aurait pu, en lui-même, conduire à une modification de l'expression de BDNF. Ces différentes observations pourraient expliquer pourquoi nous n'avons pas observé de modifications d'expression de BDNF hippocampique là où d'autres études montrent une diminution liée à l'âge (Calabrese et al., 2013) ou une augmentation liée à la consommation de polyphénols (Rendeiro et al., 2013b).

## NGF

NGF est de la même famille de protéines que BDNF et possède des propriétés similaires. Son rôle dans les processus de PLT hippocampique a été démontré dans plusieurs études (Maguire et al., 1999; Hennigan et al., 2009). De plus, une augmentation d'expression de NGF a été associée à une amélioration des performances de mémoire, en particulier chez l'animal âgé (Fischer et al., 1991; Woolf et al., 2001).

Une augmentation du niveau protéique de NGF et de son principal récepteur TrkA a été trouvée chez la souris après une consommation de polyphénols d'olive, des polyphénols différents de ceux utilisés dans notre étude (De Nicolo et al., 2013). Dans notre travail, la consommation de polyphénols de raisin et de bleuet permettait d'augmenter l'expression hippocampique des ARNm de NGF chez les animaux adultes et chez les animaux âgés.

Les effets comportementaux observés pourraient ainsi résulter de cette augmentation hippocampique des ARNm de NGF qui pourraient, après traduction, faciliter la mémoire hippocampo-dépendante.

NGF étant impliqué dans la survie, la croissance et la différenciation neuronale, nous avons étudié l'effet de l'extrait Neurophenol® sur la neurogenèse hippocampique.

### ***III.2. Effet du vieillissement et des polyphénols sur la neurogenèse adulte***

Dans notre étude, nous avons confirmé que le vieillissement altère la neurogenèse adulte dans l'hippocampe, en réduisant le nombre de nouveaux neurones immatures (McDonald and Wojtowicz, 2005). Ce nombre de nouveaux neurones n'a pas été modifié par la consommation de polyphénols. En revanche, nous avons montré que cette consommation induisait chez les souris âgées une plus grande proportion de nouveaux neurones immatures présentant des prolongements dendritiques. Ce résultat suggère que la différenciation en nouveaux neurones pourrait être favorisée par les polyphénols et/ou que la survie de ces nouveaux neurones immatures serait améliorée. Pour expliquer ce résultat, il serait intéressant d'évaluer spécifiquement le taux de survie des nouveaux neurones chez les souris âgées après consommation des polyphénols.

Dans une étude récente, une supplémentation en flavanols induisait une amélioration de la mémoire spatiale associée à une augmentation de l'angiogenèse et de la densité des épines dendritiques mais pas de la survie des nouveaux neurones dans le GD de souris (van

Praag et al., 2007). Plus récemment, il a été observé qu'une supplémentation en resvératrol augmentait l'angiogenèse et la neurogenèse dans le GD de l'hippocampe de souris (Harada et al., 2011). La neurogenèse hippocampique a été reliée directement à la cognition (Zhao et al., 2008; Stangl and Thuret, 2009) et il est admis que le vieillissement a des effets négatifs sur la neurogenèse hippocampique qui conduisent à des déficits d'apprentissage et de mémoire (Klempin and Kempermann, 2007).

Nos résultats laissent supposer que le régime supplémenté en Neurophénol® en induisant une augmentation du nombre de nouveaux neurones différenciés, a un impact positif sur l'enrichissement des réseaux neuronaux et plus globalement sur la plasticité cérébrale des animaux âgés. Ces effets neurobiologiques positifs induiraient une activation de l'hippocampe et permettraient ainsi d'expliquer l'impact comportemental des polyphénols, à savoir l'amélioration de l'apprentissage spatial des souris âgées et la mise en œuvre préférentielle de stratégies d'apprentissage spatiales, sophistiquées et efficaces qui nécessitent une activité hippocampique optimale.

#### **IV. Effet des polyphénols sur la mortalité**

Les effets de certains polyphénols sur la longévité des animaux ont été mis en évidence à plusieurs reprises (Baur and Sinclair, 2006; Peng et al., 2014). Le resvératrol en particulier présenterait des propriétés permettant d'augmenter la durée de vie (Agarwal and Baur, 2011). Il a été suggéré que cet effet du resvératrol pourrait être médié par son action sur les sirtuines, en particulier SIRT1 ainsi que par une diminution globale du stress oxydatif (Baur and Sinclair, 2006; Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2014). Cette action sur la longévité mimerait celle d'une restriction calorique connue pour avoir un effet positif sur l'espérance de vie (Agarwal and Baur, 2011; Speakman and Mitchell, 2011). Le resvératrol pourrait être le principal acteur de ces effets mais un extrait de *Ginkgo biloba* riche en polyphénols pourrait également avoir de tels effets (Winter, 1998).

Dans notre étude, nous avons montré que la supplémentation en polyphénols de raisin et de bleuet pouvait diminuer la mortalité des animaux âgés. L'extrait que nous avons utilisé contenant du resvératrol, nous pouvons suggérer que cet effet « antiviellissement » du mélange pourrait être médié par ce polyphénol. Mais nous ne pouvons pas exclure un effet potentiel des autres polyphénols pris séparément ou en synergie, en particulier si on se réfère aux études montrant des effets bénéfiques sur la durée de vie de molécules de nature non polyphénolique, présentant des propriétés anti-oxydantes globales telle que la SOD (Quick et



al., 2008) et qui suggèrent que c'est l'effet antioxydant qui est la principale cause de l'effet « antiviellissement ». L'action de l'extrait Neurophenol® sur les sirtuines et sur les paramètres antioxydants reste donc à explorer afin d'éclaircir ce dernier point.

#### **V. Biodisponibilité de l'extrait Neurophénol®**

Afin de déterminer si les polyphénols et leurs dérivés métaboliques sont capables d'avoir des effets neuroprotecteurs directs il est important de savoir s'ils sont capables d'accéder au système nerveux central. Pour que les polyphénols pénètrent dans le cerveau il leur faut dans un premier temps passer la barrière intestinale puis la BHE. Même si, encore récemment, la possibilité que les polyphénols puissent atteindre le cerveau n'était pas démontrée, des études récentes ont mis en évidence la présence de polyphenols dans les tissus cérébraux, après ingestion. Certains flavanols ont, en effet, été retrouvés dans le cerveau de rats sous forme de métabolites de catéchines et d'épicatéchines (Abd El Mohsen et al., 2002;van Praag et al., 2007;Williams et al., 2008;Ferruzzi et al., 2009;Prasain et al., 2009). Certains flavonoïdes, parmi lesquels des anthocyanes, la cyanidin-3-rutinoside et la pelargonidin-3-glucoside, semblent capables de pénétrer la BHE dans des modèles *in vitro* et *in situ* (Youdim et al., 2004). De plus, des anthocyanes ont aussi été retrouvées dans différentes régions du cerveau de rats (Andres-Lacueva et al., 2005;Passamonti et al., 2005) et de porcs après consommation de régimes supplémentés avec du bleuet (Kalt et al., 2008;Milbury and Kalt, 2010). Enfin, différentes études ont confirmé que le resvératrol administré oralement était absorbé, traversait la BHE et était incorporé dans les tissus cérébraux (Asensi et al., 2002;Wang et al., 2002;Abd El-Mohsen et al., 2006;Juan et al., 2010).

Dans notre étude nous nous sommes intéressés aux métabolites de flavanols car ils sont majoritaires dans l'extrait étudié. Une analyse UPLC-MS/MS a montré que certains flavanols et leurs métabolites pouvaient atteindre le cerveau après consommation chronique du régime enrichi en Neurophénol®. De façon intéressante, nous avons montré que même des dimères de proanthocyanidines étaient retrouvés dans le cerveau.

Les résultats de Han et al. suggèrent que l'action neuroprotective des polyphénols et du resvératrol pourrait se faire *via* l'activation de sites de liaison à un récepteur commun particulièrement présent au niveau des membranes plasmiques cellulaires dans les cerveaux de rats (Han et al., 2006). Van praag et al. suggéraient déjà en 2005 la présence de récepteurs cérébraux spécifiques aux flavanols (van Praag et al., 2005). Ces résultats laissent supposer

que les polyphénols pourraient agir directement au niveau du cerveau pour exercer leurs effets neuroprotecteurs.

Notre étude de biodisponibilité reste cependant incomplète et il semble nécessaire d'évaluer la présence d'autres métabolites de polyphénols pouvant résulter du métabolisme des polyphénols présents dans l'extrait utilisé pour nos recherches. Cette analyse est actuellement en cours de réalisation. De plus, une étude cinétique est également en cours afin d'évaluer la biodisponibilité dans le temps des composés atteignant le cerveau mais également au niveau plasmatique. Cette étude est réalisée par administration aiguë et chronique, par gavage, afin de déterminer s'il existe une accumulation des métabolites phénoliques au niveau cérébral.

## **VI. Conclusion générale et Perspectives**

Nous avons montré qu'un mélange de polyphénols extraits de raisin et de bleuet pouvait corriger les déficits mnésiques liés au vieillissement chez la souris. La consommation de ce mélange induit une modulation de l'expression de gènes impliqués dans les processus de mémoire et d'apprentissage et a un effet positif sur la neurogenèse adulte hippocampique. Par ailleurs, ce travail a permis de déterminer que ces polyphénols pouvaient après consommation par voie nutritionnelle, atteindre le cerveau des souris. Cependant, nos résultats ne nous ont pas permis de définir le rôle que pouvait avoir chaque polyphénol pris individuellement ou leurs métabolites de façon indépendante dans l'effet global observé. De telles informations permettraient de mieux comprendre les modes d'action de chaque polyphénol et leurs effets sur les fonctions mnésiques et de déterminer si une synergie des polyphénols du mélange se déploie dans les effets observés. Une étude de l'impact des polyphénols ou de leurs métabolites purs permettrait ainsi de répondre à ces questions.

Au sein du projet Neurophenols, certains sous-programmes devraient permettre de répondre à cette question. C'est le cas, en particulier, des études menées sur des modèles cellulaires de neurones ou encore de microglies réalisées en étudiant de façon indépendante ou combinée différents polyphénols et métabolites des polyphénols présents dans l'extrait Neurophenol®. De plus, l'étude réalisée chez le chien mets en oeuvre différentes combinaisons des actifs afin d'observer les effets sur le statut oxydatif et sur les processus de mémoire. Les tests sont réalisés en supplémentant les animaux avec le mix Neurophenol®, l'extrait de raisin seul, l'extrait de bleuet seul, ou un extrait riche en épicatechines.

Pour compléter nos résultats sur la souris, nous avons déjà entrepris une étude visant à supplémenter les souris adultes et âgées avec de l'épicatechine pure afin de déterminer si les flavanols, majoritaires dans l'extrait Neurophenol®, pouvaient à eux seuls expliquer les effets du mélange observés au cours de cette thèse. Cette investigation est actuellement en cours de réalisation.

D'autres paramètres semblent importants lorsque l'on étudie les polyphénols. Le statut antioxydant des animaux pourrait en effet impacter les processus mnésiques lors du vieillissement et les polyphénols sont connus pour avoir des capacités antioxydantes (Queen and Tollefsbol, 2010; Peng et al., 2014). Différents tests pourraient ainsi nous permettre de déterminer le statut oxydatif de nos animaux. Des prélèvements de sang ont été réalisés au cours de nos études à différents temps de supplémentation. Les analyses de marqueurs d'oxydation dans ces échantillons nous permettront de savoir si la supplémentation en Neurophenol® module le statut oxydatif et ces résultats pourraient alors indiquer un autre mode d'action de cet extrait pour moduler les processus mnésiques.

De récentes études ont montré que les polyphénols pouvaient moduler le flux sanguin cérébral et que ceci pourrait résulter en une amélioration des capacités cognitives notamment *via* l'induction d'angiogénèse et la croissance de nouveaux neurones (Vafeiadou et al., 2007; Spencer, 2010). Il a été montré que la consommation d'aliments riches en flavanols, comme le cacao, ou d'(-)-épicatechine pure permettaient d'augmenter le flux sanguin périphérique (Schroeter et al., 2006). La consommation de flavanols résulterait en une augmentation aigüe des niveaux circulants de NO (nitric oxide), une augmentation de la dilatation artérielle et de la microcirculation (Stein et al., 1999; Fisher and Hollenberg, 2006; Schroeter et al., 2006). Cette propriété sur les fonctions vasculaires pourrait jouer un rôle dans la détermination des effets des flavonoïdes au niveau cérébral, en particulier sur la mémoire, connue pour être dépendante du flux sanguin cérébral (Spencer, 2010). Il a été montré que les flavonoïdes, et en particulier les flavanols, pouvaient influencer le flux sanguin cérébral (Fisher et al., 2006; Francis et al., 2006). Il est important de souligner ces effets vasculaires car une augmentation des fonctions cérébrovasculaires permettraient de faciliter la neurogenèse adulte hippocampique (Gage, 2000; Stangl and Thuret, 2009). De plus, les nouvelles cellules hippocampiques sont localisées à proximité des vaisseaux sanguins et prolifèrent en réponse aux facteurs de croissance vasculaires pouvant ainsi influencer les processus mnésiques (Palmer et al., 2000). De plus, il semble évident qu'une augmentation du flux sanguin permet un apport plus rapide au niveau cérébral des nutriments nécessaires à un bon fonctionnement

du cerveau. Nous n'avons pas mesuré les paramètres vasculaires dans notre étude chez la souris. En revanche, les paramètres vasculaires tels que la tension artérielle seront mesurés au cours de l'étude clinique permettant ainsi de déterminer si la supplémentation en Neurophenol® module le flux sanguin chez l'Homme.

L'étude clinique nous permettra enfin de conclure sur les effets d'une supplémentation en Neurophenol® sur les fonctions mnésiques chez la personne âgée. Les analyses biomoléculaires qui seront réalisées compléteront les informations sur les mécanismes d'actions des polyphénols.

Les investigations chez le chien âgé réalisées dans le cadre du projet Neurophénols (Oniris, SPF Diana) permettront également d'apporter de nouvelles informations sur l'action des polyphénols de raisin et de bleuet et de leur mélange au cours du vieillissement sur la mémoire et d'autres paramètres physiologiques tels que le statut oxydatif.

Enfin, l'étude menée chez les souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer, dans l'équipe de Frédéric Calon à l'Université Laval, permettra de déterminer si une supplémentation en extrait Neurophenol® est efficace pour lutter contre la mise en place de cette pathologie et contre les déficits mnésiques observés chez ce modèle.

A l'issue du projet Neurophénols, les résultats obtenus devraient nous permettre de statuer sur l'efficacité de l'extrait Neurophenol® sur les fonctions cognitives au cours du vieillissement chez l'Homme et l'animal. Les différentes investigations réalisées nous permettront de proposer des modes d'actions potentiels des polyphénols utilisés. Les résultats obtenus au cours de cette thèse apportent déjà des résultats importants pour ce projet en montrant l'effet bénéfique d'une supplémentation en Neurophenol® sur les fonctions mnésiques chez la souris et en apportant des informations sur les modes d'actions au niveau moléculaire et cellulaire des polyphénols tels que la régulation d'expression de gènes impliqués dans la plasticité cérébrale et la modulation de la neurogenèse adulte hippocampique.

## **VII. General conclusion and Perspectives**

We have shown that a mix of polyphenol-rich extracts from grape and blueberry could correct age-related memory deficits in mice. The consumption of this mix leads to a modulation of gene expression involved in learning and memory processes and to a beneficial effect on adult hippocampal neurogenesis. Besides, this work has allowed to determine that these polyphenols could reach the mouse brain when they are incorporated in the animal diet. However, our results did not permit to define the role of each polyphenol individually or their metabolites independently in the global observed effect. Such information would allow a better understanding of the modes of action of each polyphenol and their effects on memory function and whether a synergy of the polyphenol mix is spread in the observed effects. A study of the impact of pure polyphenols or their metabolites would answer these questions.

Within the Neurophenols project, some subparts should answer these questions. This is particularly the case of studies on cellular models of neurons and microglia, which uses independently or in combination different polyphenols present in the Neurophenol<sup>TM</sup> extract or their metabolites. In addition, the study in dogs uses different combinations of extracts in order to evaluate their effects on oxidative status and on memory processes. Animals are supplemented with the mix Neurophenol<sup>TM</sup>, the grape extract alone, the blueberry extract alone, or an epicatechin-rich extract.

We have already begun a study to supplement adult and aged mice with pure epicatechin to determine whether flavanols, the main polyphenols in the Neurophenol<sup>TM</sup> extract, could explain on their own the effects observed with the mix. This investigation is currently in progress.

Other parameters seem important in the polyphenols studies. The antioxidant status of animals could indeed impact on memory processes during aging and polyphenols are known to have antioxidant capacity (Queen and Tollefsbol, 2010; Peng et al., 2014). Various tests may thus allow us to determine the oxidative status of our animals. Blood samples were prelevé during our studies at different times of supplementation. With analyzes of oxidation markers in these samples, we will know whether the Neurophenol<sup>TM</sup> supplementation modulates the oxidative status and these results may indicate a different mode of action of this extract to modulate memory processes.

Recent studies have shown that polyphenols can modulate cerebral blood flow and that could result in improved cognitive abilities including through the induction of angiogenesis and growth of new neurons (Vafeiadou et al., 2007; Spencer, 2010). It has been shown that the consumption of flavanol-rich foods, such as cocoa or pure epicatechin, allowed an increase of peripheral blood flow (Schroeter et al., 2006). Flavanols consumption leads to an acute increase in circulating levels of NO (nitric oxide), an increase in expansion pressure and microcirculation (Stein et al., 1999; Fisher and Hollenberg, 2006; Schroeter et al., 2006). This property on vascular function could play a role in determining the effects of flavonoids in the brain, especially on memory, known to be dependent on cerebral blood flow (Spencer, 2010). It has been shown that the flavonoids, particularly flavanols, could influence the cerebral blood flow (Fisher et al., 2006; Francis et al., 2006). It is important to underly these vascular effects because an increase in cerebrovascular function would facilitate hippocampal adult neurogenesis (Gage, 2000; Stangl and Thuret, 2009). Moreover, new hippocampal cells are located near the blood vessels and proliferate in response to vascular growth factors thus capable to influence memory processes (Palmer et al., 2000). Furthermore, it seems clear that increased blood flow allows faster input in the brain of nutrients necessary for good brain functioning. We did not measure vascular parameters in our study in mice. However, vascular parameters, such as blood pressure, will be measured in the clinical study in order to determine whether Neurophenol™ supplementation modulates the blood flow in humans.

The clinical study will finally allow concluding on the effects of a Neurophenol™ supplementation on memory function in the elderly. Biomolecular analyses carried out will complete information on the mechanisms of action of polyphenols.

The investigations realized in aged dogs in the Neurophenols project (Oniris, SPF Diana) will also provide new information on the action of polyphenols from grape and blueberry and their mixture on memory and other physiological parameters, such as oxidative status, during aging.

Finally, the study in the transgenic mouse models of Alzheimer's disease, in Frederic Calon's team at Laval University, will determine if Neurophenol™ supplementation is effective against the establishment of this disease and memory deficits observed in this model.

At the end of the Neurophenols project, the results should allow us to evaluate the effectiveness of the Neurophenol™ extract on cognitive function during aging in humans and animals. The various investigations carried out will allow us to propose potential ways of

actions of the present polyphenols. The results obtained in this thesis are already giving significant results for the project showing the beneficial effect of a Neurophenol™ supplementation on memory functions in mice and providing information on the modes of action at the molecular and cellular levels such as the regulation of gene expression involved in brain plasticity and the modulation of hippocampal adult neurogenesis.







## **ANNEXES**



## **PROTECTIVE EFFECTS OF BERRY POLYPHENOLS AGAINST AGE-RELATED COGNITIVE IMPAIRMENT**

Julien Bensalem<sup>1,2,3</sup>, Alexandre Dal-Pan<sup>4,5,6</sup>, Elodie Gillard<sup>4</sup>, Frédéric Calon<sup>4,5,6</sup>, Véronique Pallet<sup>1,2\*</sup>

1 Univ.de Bordeaux, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, 33000 Bordeaux, France.

2 INRA, Nutrition et neurobiologie intégrée, UMR 1286, 33000 Bordeaux, France.

3 Activ'Inside, 33500 Libourne, France.

4 Faculty of Pharmacy, Laval University, Quebec City, G1V 0A6, Quebec, Canada.

5 Laval University Hospital Centre, Research Center, Quebec City, Quebec, G1V 2L9, Canada.

6 Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels, Université Laval, Québec, Canada.

\* Corresponding author: Véronique Pallet, Nutrition and Integrative Neurobiology, UMR 1286 INRA – Université de Bordeaux, Bâtiment UFR de Pharmacie 2<sup>e</sup> tranche, 2<sup>e</sup> étage, case courrier 34, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France. Tel : +33 5 57 57 12 30 ; Fax: +33 5 57 57 12 27 ; E-mail : [veronique.pallet@enscbp.fr](mailto:veronique.pallet@enscbp.fr)

## 1. Introduction

Old age is well known to be associated with cognitive impairment and neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) [1]. As the elderly population increases, so will the prevalence of these age-related disorders [2-4]. In order to improve the quality of life of the elderly and to alleviate the social and economic burdens caused by dependence, it is important to develop strategies to reverse, or at least minimize, age-related cognitive decline and delay the onset of neurodegenerative diseases. To this end, nutrition-based preventive strategies are currently being attempted to avoid or delay the evolution towards dementia and thus maintain a stable cognitive state and satisfactory wellness in elderly subjects. In recent years, we have observed an intensification of research dedicated to understanding the relationship between nutrition and "healthy aging". Among foods that are potentially capable of protecting against age-related degenerative diseases, fruits and vegetables rich in polyphenols have been put forward as possible tools to delay age-related physiological and functional deficits [1, 5, 6].

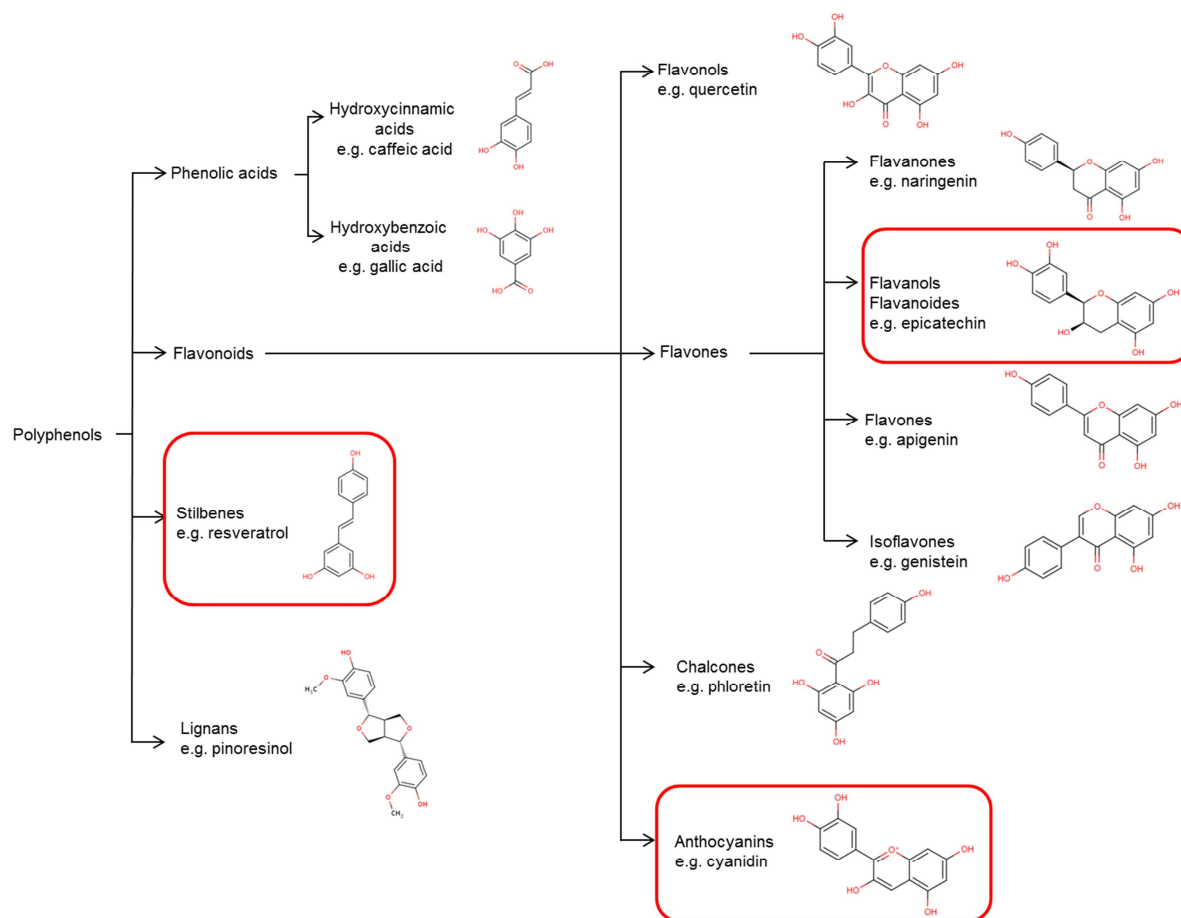
Polyphenols, particularly flavonoids, have been shown to ameliorate learning and memory processes and are today extensively studied for their potential to prevent age-related cognitive decline in both animals [7-11] and humans [12-17]. Although the mechanisms of action of flavonoids remain unclear, there is evidence that they modulate cellular and molecular processes involved in learning and memory [18]. Resveratrol, from the stilbene family, is considered among the most potent biologically active nutrients. Initially studied for its presence in red wine and its link with the "French paradox" [19], resveratrol has been shown to partially mimic caloric restriction, to extend the lifespan and to improve cognitive function and delay age-related cognitive impairment [20-25]. Together, these data suggest that high polyphenol consumption could help prevent age-related cognitive decline.

## 2. Polyphenol classification, chemical structure and food content

Polyphenols are phytochemicals now considered essential micronutrients. Polyphenols can be divided into four main classes based on their structure (**Figure 1**): flavonoids, phenolic acids, stilbenes and lignans [26]. Flavonoids constitute the major polyphenol group because they are commonly present in the human diet. Flavonoids possess a common structure consisting of two aromatic rings bound by three carbon atoms to form an oxygenated heterocycle ( $C_6-C_3-C_6$ ). Based on the hydroxylation pattern of the oxygenated heterocycle and the arrangement of the hydroxyl groups, flavonoids can be divided into four subgroups: 1) flavonols, found in onions, broccoli and chocolate, 2) flavones, 3) chalcones, present in apples, and 4) anthocyanins, found in blueberries, strawberries, red wine and common beans [27, 28]. Flavones can be further divided into four subclasses: i) flavanones, present in citrus fruits and oregano, ii) flavanols, which are abundant in green tea, red wine and chocolate, iii) flavones, found in parsley, celery and olives, and iv) isoflavones, which are mainly found in soy [27, 28]. Flavanols may be polymerized to generate flavanoids, also known as tannins or proanthocyanidins (PAs). Phenolic acids can be further classified into derivatives of benzoic acid ( $C_6-C_{1,2}$ ), found in blackberries, red wine or black tea and massively in nuts such as chestnut, and derivatives of cinnamic acid ( $C_6-C_3$ ), found in red wine, plums and olives [27, 28]. Stilbenes, found in lingonberries and cranberries [27, 28], are in turn composed of two aromatic rings bound by a methylene bridge and can be found in *cis* and *trans* forms, which have different chemical and biological properties. Interconversions between *trans* and *cis* forms are observed with heat or UV radiation. Resveratrol can also occur in dimer or trimer forms as viniferins, found in red wine. Polyphenols also include lignans, which are precursors of parietal plant polymers that constitute factors of defense against pathogens and are

characterized by a 1,4-diarylbutane structure. They are found in olive oil and sesame seeds and oil [27, 28].

As mentioned above, in this review we will focus on polyphenols from berries for their interest in the prevention of age-related cognitive decline and also of the most prevalent age-related neurodegenerative diseases. Specifically, we will review and synthesize current knowledge regarding flavanols such as catechins and epicatechins and their oligomers, the PAs, which are found in grapes, as well as anthocyanins, mainly studied in relation to blueberries. Finally, we will focus on a particular stilbene, resveratrol, known to be present in grapes and the center of considerable interest in the scientific community in recent years.



**Figure 1** | Classification and chemical structure of the main classes of polyphenols (modified from Spencer et al., 2008 [199]).

### 3. Cognitive impairment

#### 3.1. Aging brain

Cognitive aging is characterized by an age-related decrease in elementary and advanced mental abilities such as concentration, working and long-term memory, reasoning, judgment, problem solving and speed of information processing [29]. This affects different abilities in individuals and can take a “natural” or pathological form. Age-related cognitive decline is the term used to describe the non-pathological form of memory deterioration, and identifies the decline in cognitive function consequent to the aging process that is within

normal limits, given a person's age. It is a complex process, with the first signs emerging in humans in midlife (between 35 and 65 years), even without specific neurodegenerative lesions. Some pathological forms of aging may occur in addition to this "normal" cognitive decline. Among them, AD, the most common cause of dementia, affecting more than 15 million individuals worldwide [30], is irreversible in our present state of knowledge, as the only available treatments are purely symptomatic [31].

The aged brain exhibits numerous structural and functional alterations leading to the decline of cognitive and motor abilities. Furthermore, some damage characteristic of AD (amyloid plaques and neurofibrillary tangles) is frequently observed during "normal" brain aging [32, 33]. It is widely admitted that dementia is an unavoidable process beyond a certain stage of aging, and that a continuum exists between "normal" cognitive decline during aging and dementia [34], which could thus be considered an "exaggeration" or "acceleration" of aging. Thus, pathological cognitive aging appears to overlap with non-specific processes related to the "normal" aging of the brain, which also lead to cognitive impairment, and the relationship between the two is still unclear. Even the relevance of differentiating between the two processes with respect to the expression of cognitive symptoms is controversial. It has been shown that multiple brain lesions that are found in dementia also appear with normal aging; however, their density and distribution are still much lower in healthy subjects [35]. Before the development of irreversible dementia, progressive cognitive decline is noticeable by the occurrence of minor cognitive problems that affect 15 to 20% of the population aged 65 years or more, but which represent an unstable state. The natural evolution of this mild cognitive impairment could still be influenced by the implementation of secondary preventive measures [36].

In this context, a primary preventive strategy during the asymptomatic phase should focus on environmental factors such as food and nutrition. Hence, any nutritional strategy defined should aim to prevent or delay the evolution toward dementia, in order to promote the maintenance of a satisfactory cognitive state and to avoid the dependence of elderly citizens in our modern society.

### ***3.2. Neurodegenerative diseases***

#### *3.2.1. Alzheimer's disease*

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disorder in the world, exerting an escalating socioeconomic burden on modern society [37, 38]. Most often, AD is diagnosed in people over 65 years of age [39], who develop a progressive pattern of cognitive and functional impairments [40, 41] that gradually increase as the disease advances. Memory impairment, in particular the loss of the ability to form and retain new episodic memories, is a hallmark of early AD and may help in differentiating AD from common age-related cognitive decline. This impairment is often attributed to synaptic dysfunction and neuronal loss in the perforant path within the medial temporal lobe, entorhinal cortex and hippocampus [42]. Accordingly, cognitive changes in AD start with specific difficulties in the encoding and storage of new information, also indicative of a deficiency in semantic memory [43-45] and executive function impairment [46]. The etiology of AD is not well understood, except in 1 to 5% of cases in which genetic differences have been identified [47]. It is increasingly recognized that AD is a proteopathy characterized by specific neuropathological signs: amyloid deposits, tau-laden tangles and the loss of neurons and synapses in the cerebral cortex and subcortical regions, inducing gross atrophy of the affected regions [48-55]. The accumulation of amyloid beta (A $\beta$ ) fragments is thought to be due to the uncontrolled

cleavage and defective clearance of amyloid precursor protein [49]. Current treatments only partly alleviate symptoms but cannot stop or reverse the progression of the disease. Due to their favorable safety profile and availability, dietary approaches, in particular using polyphenol-enriched diets [56-58], are drawing attention as tools to prevent AD development [59-64]. The use of cheap and widely available compounds, like polyphenols, as nutraceutical or pharmaceutical tools in brain disorders such as AD may provide new strategies for the prevention or delay of cognitive decline.

### 3.2.2. *Parkinson's disease*

Parkinson's disease (PD) is a degenerative disorder of the central nervous system with no known cause, and is more common in older people, with most cases occurring after the age of 50 [65]. Dopamine-innervated brain structures, namely in the basal ganglia, are the most seriously affected brain areas in PD [66]. The clinical expression of PD presents neuropsychiatric symptoms including depression, apathy, anxiety, hallucinations and cognitive dysfunction, reaching a prevalence of about 30 to 40% at advanced stages of the disease [67, 68]. Previous observations suggest that the neuropsychological profiles of PD and AD are different, with PD subjects being better at recall but worse at praxis than those with AD [69]. PD patients also display impairments in verbal fluency, visual perception and performance tasks [69, 70], suggesting impairments in the executive and visuospatial domains [71]. Many risk and protective factors for PD have been investigated. An increased risk of PD is associated with exposure to certain pesticides, insecticides and heavy metals [72-74], in contrast with a lower risk in tobacco smokers [74], coffee consumers [75] and individuals treated with anti-inflammatory drugs [74]. Although modern treatments are effective at managing the early motor symptoms of the disease [76], and surgery and deep-brain stimulation can be of use when drugs do not suffice to control symptoms [77], there is currently no cure for PD. Interestingly, a diet enriched in polyphenol compounds has shown some efficacy in alleviating the symptoms of PD [78, 79].

## 4. **The effects of berries on age-related cognitive decline**

Most studies of berries and age-related cognitive decline focus on specific berries high in antioxidants such as blueberries, strawberries or grapes. Blueberries, which contain large amounts of polyphenols, possess a greater antioxidant capacity than most other fruits and vegetables [80]. A number of studies have reported that the consumption of blueberries can retard age-related physiological and functional deficits. Thus, the daily consumption of blueberry juice for 12 weeks improves episodic memory performance in older adults (mean age: 76.2 years) [13]. Consistent with these results, work carried out in aged rats has shown the beneficial effects of blueberries on memory and motor performance, resulting in the attenuation of memory decline as evaluated in object recognition and spatial working memory tasks [9, 81]. From a mechanistic point of view, a blueberry-enriched diet administered to very old rats (24 months old) compared to younger rats normalizes the level of NMDA-receptor-dependent long-term potentiation (LTP) in their hippocampus. LTP is widely recognized as a cellular correlate of memory formation, and this result suggests the normalization of synaptic plasticity by diet [82]. A more recent study in a senescence-accelerated mouse model also proposes that the beneficial effects of blueberry on cognitive decline could be due to an increase in the expression of phosphorylated extracellular signal-regulated kinases (ERKs). The authors of this study also suggest that this promnesic effect of blueberry polyphenols may be due to their antioxidant activity and their capacity to activate superoxide dismutase (SOD) and to reduce malondialdehyde content [83]. However, it is



currently admitted that the effects of blueberry extracts on cognitive functions involve more than their antioxidant actions. Thus, a diet containing blueberry extracts significantly decreases brain levels of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) in aged rats compared to controls [81]. These brain levels of NF- $\kappa$ B are significantly higher in aged rats than younger ones [84]. These results are in accordance with the known effect of flavonoids on cellular signaling, especially on NF- $\kappa$ B activity [85, 86]. Studies on strawberries highlight the high antioxidant and anti-inflammatory activity of these fruits, which may prevent the appearance of neurochemical and behavioral alterations with aging. Thus, a strawberry supplement prevents the effects of aging on neuronal signal transduction and improves memory processes in aged rats [84, 87] and in a rodent model of accelerating aging [88]. The grape is a very interesting berry because it is rich in flavonoids including catechins, epicatechins and quercetins as well as anthocyanins and PAs, all known to have potent antioxidant capacities. In recent years, the “French Paradox” has sparked a renewed interest in grape polyphenols with respect to their potential benefits to human health, including brain health. Indeed, the strikingly lower incidence of coronary disease in France compared with other western countries has opened up a field of questions, and the hypothesis of the protective role of the oxidation of polyphenols contained in red wines has emerged and has been widely studied since. *De facto*, the nutritional properties of grapes as the source of wine polyphenols are also the subject of numerous studies. Similar to results obtained with blueberry juice, Concord grape juice consumption for 12 weeks leads to an improvement of memory performance in older humans [14]. A similar effect has been observed in aged rats with Concord grape juice supplementation [89]. Specific extracts of the berries (e.g. grape seed extracts, GSEs) are more commonly used for nutritional intervention because they are highly enriched in polyphenols, in particular in flavanols, anthocyanins and resveratrol. These extracts are suitable for nutritional supplementation, as they contain a higher concentration of polyphenols than those in fruits or juices, and this facilitates the identification of their functional and behavioral effects and the study of the underlying neurobiological mechanisms. More recently, the beneficial effects of blackberries and mulberries on age-related memory deficits as well as on motor behavior have been shown in aged rats [90] and in senescence-accelerated mice [91].

Together, these data argue in favor of the use of berry extracts as dietary supplements to target memory performance, and to better understand the mechanisms underlying their beneficial effects.

## 5. Flavanols

### 5.1. Effects on age-related cognitive decline

A recent study has provided detailed information on habitual dietary intake of flavanols, in particular flavan-3-ol monomers, PAs and theaflavins, in adults aged 18–64 years in the European Union. This study demonstrates that dietary intake amounts for flavan-3-ol monomers, PAs and theaflavins vary significantly across European countries (181 mg/d to 793 mg/d). Moreover, the average habitual intake of flavan-3-ols is considerably below the amounts used in most dietary intervention studies [92]. Several studies have shown the beneficial effects of flavanols on cognitive performance. Their molecular impact has also been investigated *in vitro* and *in vivo*. Some studies have evaluated the benefits of supplementation with flavanols from GSEs. Indeed, GSEs are a rich source of monomeric phenolic compounds such as catechin, epicatechin and dimeric, trimeric and tetrameric PAs. Supplementation with GSE significantly improved the memory performance of aged rats evaluated using a brightness-discrimination task in a T-maze. This beneficial effect might be

explained by reduced blood glucose levels and decreased oxidative stress in the hippocampus [93, 94]. Indeed, the promnesic effects of GSEs are due to the stimulation of antioxidant defense mechanisms, attenuating lipid peroxidation and protein oxidation. A positive effect on the cholinergic system, which also underlies the beneficial activity of GSEs on memory, has also been observed [93, 95]. A recent study has also evaluated the impact of pure flavanols on memory and the underlying molecular mechanisms in 18-month-old male rats. A significant improvement in spatial working memory is observed in rats receiving pure flavanols (catechin and epicatechin) at levels similar to that found in blueberries (2% w/w) for 6 weeks. Interestingly, this behavioral effect was linked with an increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF), thus confirming the therapeutic value of polyphenol extracts in memory processes [96]. Epicatechin, administered for 6 weeks, combined with physical exercise, enhances spatial learning and reference memory, increases angiogenesis and neuronal spine density in the hippocampal dentate gyrus (DG), and upregulates hippocampal genes associated with learning concomitant with the decreased expression of inflammation and cell death genes. In the absence of physical exercise, epicatechin still has an effect, but to a lower extent, on spatial memory retention and angiogenesis in the DG as well as on gene expression [97]. The flavanols (-)-epicatechin and 3-O-methyl(-)-epicatechin, one of its metabolites, exerted a stimulatory effect on ERK1/2 and on the downstream transcription factor C-AMP Response Element-Binding protein (CREB). Moreover, these flavanols protected neurons against oxidative damage via a mechanism involving the suppression of *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), and its downstream partners, *c-Jun* and *pro-caspase-3* [98, 99]. In addition, it has been shown *in vitro*, in glial cells, that catechin from green tea protects cells from oxidative stress-induced DNA damage and decreases cell death by reducing NF- $\kappa$ B and p53 activity [100]. Moreover, physiologically relevant concentrations of epicatechin and catechin inhibit TNF- $\alpha$ , which is released by primary glial cells, suggesting that flavanols may also have the potential to exert anti-inflammatory effects in the central nervous system [101].

## 5.2. Therapeutic potential in neurodegenerative diseases

Data gathered in various models of neurodegenerative diseases provide arguments for the use of flavanols in neuroprotection. For example, various flavanol-rich cocoa extracts inhibit the oligomerization of A $\beta$  fragments 40 and 42 in the mouse hippocampal region, while one extract, Lavado, also rescues the LTP response after damage by A $\beta$  fragments [102]. Along these lines, rats given an oral dose of the flavanol epicatechin before being injected with A $\beta$  fragments 25-35 directly into the CA1 subregion of the hippocampus show a 43% and a 42% increase in spatial learning and memory performance, respectively, when compared with A $\beta$ -injected untreated rats [103]. Epicatechins also inhibit damage due to reactive oxygen species (ROS) generated by A $\beta$  fragments [103]. Similarly, Wistar rats fed catechins for 21 days prior to intracerebroventricular injections of streptozotocin (STZ), used to model sporadic AD, present a dose-dependent amelioration of both path length and latency in the Morris Water Maze task [104]. More interestingly, Desideri et al. have tested the effect of cocoa flavanols on humans suffering from mild cognitive impairment and found that, on average, greater daily oral doses of flavanols over a period of 8 weeks are associated with an enhancement of cognitive function [105]. These studies support the potential of flavanols in preventing memory loss, cognitive impairment and oxidative stress induced by A $\beta$  fragments, all prominent features of AD. Moreover, several studies have provided evidence of the neuroprotective activity of flavanols in both cellular and animal models of PD. For example, the intragastric administration of catechins in mice protects, in a dose-dependent manner, *substantia nigra* dopaminergic neurons from the effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-

tetrahydropyridine (MPTP) injections [106]. In a similar experiment, SH-SY5Y cells exposed to the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>) showed greater viability, as well as decreased ROS production when pretreated with catechins [107]. However, the neuroprotective activity of catechins may result not only from their free-radical scavenger properties but also from their implication in several cellular signaling pathways involving JNK or GSK-3 $\beta$  [106]. Furthermore, in the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) rat model of PD, intraperitoneal treatment with catechins prevents working memory deficits and mesencephalic dopamine loss as well as motor impairments [108]. Taken together, these findings suggest that flavanols may have therapeutic potential in neurodegenerative diseases, particularly in the PD field. Further investigations are required to elucidate the molecular mechanisms underlying the neuroprotective effects of flavanols.

## 6. Anthocyanins

### 6.1. Effects on age-related cognitive decline

Most studies performed in order to assess the potential effects of anthocyanins on health have been carried out using fruit extracts rich in anthocyanins, but some have used metabolites of anthocyanins. Anthocyanins are major dietary components especially in those who routinely eat berries or derivatives such as juices or red wine [28]. Unlike other flavonoids that are absorbed and excreted, anthocyanins do not appear to undergo extensive metabolism to glucuronide and sulfate derivatives, and their excretion is low. In interventional studies in humans, the typical recovery of anthocyanins in the urine is <0.1% of intake [109]. For instance, Wu et al. have reported the total urinary excretion of anthocyanins from blueberries consumed by elderly women to be 0.004% of intake [110]. These low recovery levels could be a consequence of anthocyanins undergoing structural rearrangements in response to pH changes. Such rearrangements are likely to occur *in vivo* as anthocyanins pass from a low pH in the stomach to the more basic conditions of the small intestine.

In rodent studies, the consumption of foods rich in anthocyanins prevents memory deficits [89, 111-113]. Thus, a 3-month supplementation with a blueberry-enriched diet improves spatial working memory performance of aged rats [9]. The activation of CREB and ERK1/2, an increase in the levels of both BDNF and pro-BDNF as well as of CaMKII, CaMKIV, PKA, Akt, mTOR and Arc/Arg3 in the hippocampus seems to underlie these behavioral effects. Similar effects have been shown using both pure anthocyanins and extracts. Thus, a 6-week supplementation with pure anthocyanins in 18-month-old rats induces significant improvements in spatial memory linked with an increase in hippocampal BDNF levels [96]. A purple sweet potato color extract administered for 4 weeks by gavage in a mouse model of accelerated aging induced by D-galactose (D-gal), attenuates D-gal-induced cognitive impairment, partly via the improvement of antioxidant and anti-inflammatory responses [114]. In the same manner, in SAMP8 mice, another model of accelerated aging, 12 weeks of supplementation with a mulberry extract rich in anthocyanins improves learning and memory abilities and has hepatoprotective effects through the regulation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs, e.g. JNK, p38, ERK) and the activation of Nrf2 [91]. Likewise, it has recently been shown that 8 weeks of supplementation with cyanidin-3-O-galactoside from blueberries improves learning and memory in the same animal model. The recovery of cognitive and behavioral functions in aged animals could be explained by an improvement of oxidative status via the activation of SOD and a reduction in the malondialdehyde content of brain tissue and plasma. Furthermore, an increase in phosphorylated ERK in the hippocampus, an inhibition of damage to the pyramidal cell layer and more generally, an improvement of hippocampal neuron survival, have also been observed [83]. Interestingly,

these beneficial effects of anthocyanins on cognitive function have also been reported in young mice (3-4 months old) and rats (10 weeks and 12 months old), in which they improve learning and memory performance. At the molecular level, these studies have reported reduced oxidative DNA damage in brain tissue, a lower level of lipid peroxidation, higher brain levels of ascorbic acid and glutathione, and a decrease in acetylcholinesterase activity. Moreover, the modulation of ERK1/2 activation and the increase of CREB, BDNF and pro-BDNF levels in the hippocampus have also been reported [111, 113, 115, 116]. More recently, an important effect on hippocampal synaptic plasticity has been evidenced in young rats (8 weeks old) fed for a short period (3 weeks) with blueberries by gavage. In addition to improved spatial memory acquisition and consolidation, increased levels of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM), a marker of neuronal plasticity, in the DG, accompanied by an increase in hippocampal NR2B-containing NMDA receptors, have been observed in rats fed by gavage with blueberries. [117]. It has also been suggested that polyphenols could act on the inflammatory process. The exposure of microglial cells to an anthocyanin-rich blueberry extract induces the significant suppression of the expression of both the iNOS and COX-2 genes [118]. However, in another study, when activated microglia were exposed to the pure anthocyanins, cyanidin and pelargonidin, no effects on iNOS expression or TNF- $\alpha$  release were observed [101].

## **6.2. Therapeutic potential in neurodegenerative diseases**

Besides their abovementioned properties in aging, anthocyanins could also alter specific pathophysiological processes related to various neurodegenerative disorders. For instance, Tarozzi et al. have shown that the anthocyanin cyanidin-3-O-glucoside (C3G) protects SH-S5Y5 human cells against the neurotoxicity induced by A $\beta$  oligomers, probably by preventing them from binding to the cell membrane [119]. In addition, a recent *in silico* simulation has revealed that anthocyanins could induce conformational changes that activate the FKPB52 protein complex [120]. There is evidence that the expression of this protein complex in turn inhibits the aggregation of tau [121]. In animal models, anthocyanin gavage for one week prior to an intracerebral injection of STZ prevents memory deficits in Wistar rats [122]. In a similar study, intraperitoneal treatment with anthocyanins also protected against the memory impairment elicited by injections of scopolamine, used to imitate memory impairment in AD [123]. These studies support the potential of anthocyanins or their metabolites to prevent AD or slow its progression. Moreover, there is also evidence of the neuroprotective activity of anthocyanins in models of PD. For example, in primary cultures of midbrain cells, a series of anthocyanins isolated from blackcurrants, including delphinidin-3-O-glucoside and C3G, reduces dopaminergic cell death induced by rotenone [124], an insecticide known to cause nigral neurodegeneration *in vivo*. Anthocyanins display inhibitory effects on monoamine oxidase B (MAOB), an action similar albeit smaller than that of drugs currently used to treat early PD [125]. Together, these investigations highlight the therapeutic potential of anthocyanins in neurodegenerative diseases. However, more preclinical and clinical studies investigating the effects of pure anthocyanins and their derivatives are required to determine their potential benefits in AD or PD.

## **7. Stilbenes: Resveratrol**

### **7.1. Effects on age-related cognitive decline**

Resveratrol is a polyphenol found mainly in grapes and red wine. It possesses diverse biological activities that confer protection against oxidative stress, inflammation, cardiovascular disease, and cancer [126-130]. As mentioned previously, resveratrol also exerts beneficial effects on age-related cognitive impairment. Indeed, resveratrol can, for

example, improve working memory, spatial learning and memory and spontaneous locomotor activity in various animal models such as *Microcebus* or aged mice with LPS-induced deficits [25, 131, 132]. Recently, a significant enhancement of angiogenesis and neurogenesis has been observed in the DG of these mice [25]. One of the main hypotheses to explain how resveratrol induces these beneficial health effects *in vivo* is the modulation of sirtuin 1 (SIRT1), one of seven proteins belonging to the sirtuin family and an energy sensor involved in longevity. Many studies have evaluated this mechanism, seeking to determine if the interaction between SIRT1 and resveratrol is direct or indirect, but for the moment this point is still under debate. Indeed, there is much data to support the hypothesis that SIRT1 is activated by resveratrol [126, 133-144]. Resveratrol also indirectly inhibits the PI3K/mTOR/S6K pathway [145-149]. SIRT1 and mTOR could be members of the same sirtuin/mTOR network [150], and it is likely that mTOR (pro-aging pathway) and sirtuins (anti-aging pathway) antagonize each other [151]. Han *et al.* have investigated the possible existence of specific polyphenol-binding sites at the cell membrane level in the rat brain [152]. Their results suggest that the neuroprotective action of various polyphenols and resveratrol analogs could be mediated by the activation of common “receptor” binding sites that are particularly enriched at the level of the cell membrane.

In addition to the above pathways, resveratrol could act through the cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase pathways, crucial for the production of pro-inflammatory molecules [153]. Inhibitors of these enzymes are commonly used as anti-inflammatory drugs. Because resveratrol is an effective *in vivo* inhibitor of COX activity [154-156], its anti-inflammatory properties have been investigated. Intravenously administered resveratrol decreases inflammation induced by ischemia/reperfusion [157]. The anti-inflammatory effects of resveratrol in aged mice could also be linked to its ability to inhibit factors involved in gene transcription such as MAPKs, AP-1 and NF- $\kappa$ B [133, 158-161]. The link between SIRT1 and NF- $\kappa$ B signaling is particularly interesting because, according to a number of authors, SIRT1 can prolong the lifespan by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling to an extent sufficient to reverse gene expression changes associated with aging in mice [160, 162, 163]. Moreover, a reduction in the levels of inflammatory markers such as interleukin-1 $\beta$  has been observed in resveratrol-supplemented mice in both the plasma and hippocampus. The *in vitro* analysis of its impact on microglial cells has confirmed that resveratrol potently inhibits LPS-induced interleukin-1 $\beta$  production [131]. Thus, resveratrol could present an attractive alternative to current treatments against chronic inflammation. Resveratrol also has considerable antioxidant activity, although it is unclear if this is the result of a direct scavenging effect or the activation of pathways that upregulate natural cellular antioxidant defenses. Resveratrol can inhibit the production of ROS by neutrophils, monocytes, and macrophages [164-168]. In spontaneously hypertensive rats, which are prone to stroke, resveratrol significantly reduces markers of oxidative stress in the serum and urine [169]. Furthermore, in guinea pigs, resveratrol decreases the concentration of ROS generated by menadione [170]. These data indicate that resveratrol can suppress pathological increases in the peroxidation of lipids and other macromolecules *in vivo*, but whether the mechanism is direct, indirect or both has yet to be determined. There are other data in support of these protective effects. For instance, resveratrol can dramatically increase mitochondrial manganese SOD expression and activity in MRC-5 cells, as well as in mouse brain tissue [171]. Despite all these arguments, it is important to emphasize that, even if the scientific literature widely credit resveratrol with being responsible for the protective effects of red wine [172, 173], it is certainly not the only cause. Indeed, stilbene concentrations in red wine are so low that a human being would have to consume more than 60 liters daily to reach the levels required to increase longevity and provide the same protective effects as those observed in animal models [174]. Resveratrol is

thus an extremely minor component of the human diet, and its potential therapeutic use would only be possible at pharmacological doses.

### 7.2. Therapeutic potential in neurodegenerative diseases

The potential neuroprotective action of resveratrol *in vitro* and *in vivo* has attracted a lot of interest pertaining to its use in preventing neurodegenerative diseases [175]. For example, in transgenic animal models of AD-like neuropathology, chronic resveratrol administration promotes neuronal survival in the hippocampus [176], prevents learning deficits [176] and reduces plaque pathology by 50 to 90% depending on the brain region studied [177]. The potential therapeutic activity of resveratrol in AD has also been reported by Marambaud et al., who tested the neuroprotective activity of various polyphenols such as resveratrol, quercetin and catechin in a series of cell lines. Resveratrol was particularly effective in reducing, in a dose-dependent manner, the production of intracellular A $\beta$  peptides via a proteasome-dependent mechanism [178]. Similarly, oral administration of a grape-seed polyphenol extract containing resveratrol significantly attenuates the development of tau neuropathology in a mouse model of AD [179]. Treatment with a standardized grape polyphenol preparation containing resveratrol leads to the improvement of cognitive function and greatly reduces total amyloid content in the brain of J20 AD mice, an animal model of A $\beta$  pathology [180]. According to recent work, chronic resveratrol administration leads to decreases in the ratio of soluble A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 (-42%) and the concentration of insoluble human tau (-93%) in the parietotemporal cortex of 18-month-old mice in a triple-transgenic model of AD [181]. More importantly, because this study used a wash-out study design, it showed that these effects of resveratrol on the A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio and insoluble tau lasted for at least 3 months after the end of treatment, consistent with the disease-modifying effects of resveratrol. In the PD field, a dose-dependent protective role of resveratrol on dopaminergic neurons in midbrain slice cultures from Wistar rats exposed to cytotoxic drugs, MPP<sup>+</sup> or thrombin has been reported, highlighting the possible antioxidant effect of resveratrol in this disease [182]. Studies carried out in mice show that resveratrol administration protects mice from MPTP-induced hydroxyl radical overloading and dopaminergic neuron loss [79, 183]. This action has been attributed to the resveratrol-induced activation of SIRT1, as the protective effect is lost in the presence of a SIRT1 inhibitor [184]. Overall, although the modulating effect of polyphenols on oxidative stress remains an essential element, it is becoming clear that other cellular mechanisms also underlie the central effects of resveratrol and its metabolites in AD and PD [185]. The consumption of resveratrol-rich foods, such as berries, cocoa and grapes [64], throughout life holds strong potential to limit or delay neurodegeneration and to prevent or reverse the age-dependent deterioration in cognitive performance.

## 8. Brain bioavailability

In order to understand whether polyphenols and their metabolic derivatives are capable of directly inducing neuroprotective effects, it is important to know whether they can access the central nervous system. To enter the brain, absorbed polyphenols must first cross the blood brain barrier (BBB). Some studies have reported that polyphenols can be found in brain tissue after oral ingestion. However, how polyphenols cross the BBB is still under debate.

For instance, some flavanols, such as metabolites of catechin and epicatechin, can be found in the rat brain [9, 97, 186-188]. Certain flavonoids, including some dietary anthocyanins such as cyanidin-3-rutinoside and pelargonidin-3-glucoside, are also able to cross the BBB in relevant *in vitro* and *in situ* models [189]. Moreover, anthocyanins have also

been detected in different regions of the brain of rats [190] and pigs fed blueberries [191, 192], and at trace levels in brains of rats fed a blueberry extract-enriched diet containing unspecified amounts of anthocyanins for 10 weeks [10]. Similarly, in pigs given a 4-week supplementation of blueberry extract containing undefined amounts of anthocyanins, 300 pg/g of anthocyanins have been detected in the cerebellar tissue and 700 pg/g in the eye tissue [191]. In a much shorter time frame, 18h after the administration of pelargonidin by gavage (50 mg/kg of body weight), unmetabolized anthocyanin has been detected in the rat brain at a concentration of 0.2 nmol/g (wet weight) [193]. In contrast, in another study, there were no detectable anthocyanins in the brain of rats 24h after acute administration by gavage of 2.8 ml of raspberry juice, which is a nutritionally-relevant dose equivalent to 700ml of juice for a 70-kg human [194]. Finally, several reports have confirmed that orally administered resveratrol is indeed absorbed by the organism, crosses the BBB and is incorporated into the brain [195-198].

## **9. Conclusion**

The constantly increasing number of elderly people is dramatically linked with an increase in the prevalence of neurodegenerative diseases. This is one of the major medical and socio-economic challenges of modern societies. Various mechanisms leading to memory deficiency with aging have been described. Among these, inflammation, the modification of oxidative status and DNA damage can all have a strong impact on memory processes, reducing cerebral plasticity and leading to the loss of neurons and the diminution of synaptic connectivity. The development of functional foods with “anti-aging” activity is thus of overwhelming interest to both the general public and scientific communities. As discussed in this review, it appears that berries, which are rich in phenolic compounds, exert beneficial effects by attenuating age-related cognitive decline and the development of neurodegenerative diseases. Both berries and well-characterized polyphenols such as flavanols, anthocyanins and resveratrol can have beneficial effects on the brain, and more broadly, have been shown to display important biological properties. To better understand their neuroprotective effects, it is essential to identify their active ingredients and their mechanisms of action. Polyphenols are ubiquitous in plant foods and beverages and can therefore be consumed daily in the diet. They have often been generically referred to as “antioxidants”, but a number of different mechanisms underlie the potential of polyphenols to improve neurological health, including their ability to interact with neuronal and glial signaling, to reduce neuronal damage and loss induced by neurotoxins or neuroinflammation, to alter ROS production as well as to attenuate the accumulation of dementia-promoting metabolites, such as A $\beta$ . However the majority of the data used to support this neuroprotective effect comes from studies dealing with a complex mix of compounds with high polyphenol contents. Furthermore, the effects of the structural changes undergone by polyphenols during metabolism and their interaction with the BBB have not yet been adequately studied to draw clear conclusions as to the neuroprotective mechanisms involved. Moreover, most of these studies have been performed in animals, and it is now important to develop clinical studies to validate these observations in humans. Indeed, nutritional intervention studies must be carried out to confirm that polyphenols could be a valuable asset in strategies aimed at delaying or preventing age-related cognitive decline and the development of neurodegenerative diseases in human. Since there is much evidence in the literature in favor of the preventive and therapeutic benefits of polyphenols, to understand their mechanisms and the timing and scope of administration of these compounds in aging and disease processes is an achievable goal. Further investigations are now needed to expand our understanding of the dynamic role these dietary compounds play in the alleviation of age-associated risk factors in the brain.

## References

- [1] Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;81(1 Suppl):313S-6S.
- [2] Esposito E, Rotilio D, Di Matteo V, Di Giulio C, Cacchio M, Algeri S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of aging*. 2002;23(5):719-35.
- [3] Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, et al. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA*. 1989;262(18):2551-6.
- [4] Nicita-Mauro V. Parkinson's disease, Parkinsonism and aging. *Archives of gerontology and geriatrics Supplement*. 2002;8:225-38.
- [5] Queen BL, Tollefsbol TO. Polyphenols and aging. *Current aging science*. 2010;3(1):34-42.
- [6] Gomez-Pinilla F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nature reviews Neuroscience*. 2008;9(7):568-78.
- [7] Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, Hara Y, Shido O. Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *The Journal of nutrition*. 2006;136(4):1043-7.
- [8] Kaur T, Pathak CM, Pandhi P, Khanduja KL. Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. *Brain and cognition*. 2008;67(1):25-30.
- [9] Williams CM, El Mohsen MA, Vauzour D, Rendeiro C, Butler LT, Ellis JA, et al. Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free radical biology & medicine*. 2008;45(3):295-305.
- [10] Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutritional neuroscience*. 2005;8(2):111-20.
- [11] Shukitt-Hale B, Lau FC, Joseph JA. Berry fruit supplementation and the aging brain. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(3):636-41.
- [12] Dinges DF. Cocoa flavanols, cerebral blood flow, cognition, and health: going forward. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2006;47 Suppl 2:S221-3.
- [13] Krikorian R, Shidler MD, Nash TA, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk MR, Shukitt-Hale B, et al. Blueberry supplementation improves memory in older adults. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(7):3996-4000.
- [14] Krikorian R, Nash TA, Shidler MD, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Concord grape juice supplementation improves memory function in older adults with mild cognitive impairment. *The British journal of nutrition*. 2010;103(5):730-4.
- [15] Krikorian R, Boespflug EL, Fleck DE, Stein AL, Wightman JD, Shidler MD, et al. Concord grape juice supplementation and neurocognitive function in human aging. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012;60(23):5736-42.
- [16] Letenneur L. Risk of dementia and alcohol and wine consumption: a review of recent results. *Biological research*. 2004;37(2):189-93.
- [17] Letenneur L, Proust-Lima C, Le Gouge A, Dartigues JF, Barberger-Gateau P. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *American journal of epidemiology*. 2007;165(12):1364-71.
- [18] Spencer JP, Vauzour D, Rendeiro C. Flavonoids and cognition: the molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2009;492(1-2):1-9.
- [19] Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free radical biology & medicine*. 2002;32(4):314-8.
- [20] Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang J, Hacker TA, et al. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PloS one*. 2008;3(6):e2264.



- [21] Agarwal B, Baur JA. Resveratrol and life extension. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1215:138-43.
- [22] Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell metabolism*. 2008;8(2):157-68.
- [23] Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellierino A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current biology : CB*. 2006;16(3):296-300.
- [24] Dal-Pan A, Terrien J, Pifferi F, Botalla R, Hardy I, Marchal J, et al. Caloric restriction or resveratrol supplementation and ageing in a non-human primate: first-year outcome of the RESTRIKAL study in *Microcebus murinus*. *Age (Dordr)*. 2011;33(1):15-31.
- [25] Harada N, Zhao J, Kurihara H, Nakagata N, Okajima K. Resveratrol improves cognitive function in mice by increasing production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2011;22(12):1150-9.
- [26] Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(5):727-47.
- [27] Collin S, Crouzet J. Polyphénols et procédés : transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agroalimentaire: Lavoisier; 2011.
- [28] Phenol-Explorer. <http://www.phenol-explorer.eu>.
- [29] Park DC, Reuter-Lorenz P. The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annual review of psychology*. 2009;60:173-96.
- [30] Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006;368(9533):387-403.
- [31] Walker LC, Ibegbu CC, Todd CW, Robinson HL, Jucker M, LeVine H, 3rd, et al. Emerging prospects for the disease-modifying treatment of Alzheimer's disease. *Biochemical pharmacology*. 2005;69(7):1001-8.
- [32] Seno H, Parisi JE, Okazaki H, Ishino H. 478 Neuronal Loss, Neurofibrillary Tangles and Senile Plaques in normal aging and Alzheimer's disease: A quantitative study of the hippocampus and the entorhinal cortex. *Neurobiology of aging*. 1996;17(4):S119.
- [33] Morris JC, Storandt M, McKeel DW, Jr., Rubin EH, Price JL, Grant EA, et al. Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: Evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease. *Neurology*. 1996;46(3):707-19.
- [34] Drachman DA. If we live long enough, will we all be demented? *Neurology*. 1994;44(9):1563-5.
- [35] Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, et al. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiology of aging*. 1992;13(1):179-89.
- [36] Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *Journal of internal medicine*. 2004;256(3):183-94.
- [37] Wimo A, Jönsson L, Bond J, Prince M, Winblad B. The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimers Dement*. 2013;9(1):1-11.e3.
- [38] Meek PD, McKeithan K, Schumock GT. Economic considerations in Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy*. 1998;18(2 Pt 2):68-73; discussion 9-82.
- [39] Brookmeyer R, Gray S, Kawas C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *American journal of public health*. 1998;88(9):1337-42.
- [40] Forstl H, Kurz A. Clinical features of Alzheimer's disease. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 1999;249(6):288-90.
- [41] Khan Z, Martín-Montañez E, Navarro-Lobato I, Muly E. Memory deficits in aging and neurological diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;122:1-29.
- [42] Celone KA, Calhoun VD, Dickerson BC, Atri A, Chua EF, Miller SL, et al. Alterations in Memory Networks in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: An Independent Component Analysis. *The Journal of Neuroscience*. 2006;26(40):10222-31.
- [43] Gainotti G, Quaranta D, Vita MG, Marra C. Neuropsychological Predictors of Conversion from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2014;38(3):481-95.

- [44] Jak AJ, Bangen KJ, Wierenga CE, Delano-Wood L, Corey-Bloom J, Bondi MW. Contributions of Neuropsychology and Neuroimaging to Understanding Clinical Subtypes of Mild Cognitive Impairment. In: Alireza M, editor. *International Review of Neurobiology*. Volume 84: Academic Press; 2009. p. 81-103.
- [45] Peña-Casanova J, Sánchez-Benavides G, de Sola S, Manero-Borrás RM, Casals-Coll M. Neuropsychology of Alzheimer's Disease. *Archives of medical research*. 2012;43(8):686-93.
- [46] Molinuevo JL, Gómez-Anson B, Monte GC, Bosch B, Sánchez-Valle R, Rami L. Neuropsychological profile of prodromal Alzheimer's disease (Prd-AD) and their radiological correlates. *Archives of gerontology and geriatrics*. 2009;52(2):190-6.
- [47] Rao AT, Degnan AJ, Levy LM. Genetics of Alzheimer Disease. *American Journal of Neuroradiology*. 2013.
- [48] Wenk GL. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *The Journal of clinical psychiatry*. 2003;64 Suppl 9:7-10.
- [49] Hooper NM. Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochemical Society transactions*. 2005;33(Pt 2):335-8.
- [50] Prakasam A, Muthuswamy A, Ablonczy Z, Greig NH, Fauq A, Rao KJ, et al. Differential accumulation of secreted AbetaPP metabolites in ocular fluids. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2010;20(4):1243-53.
- [51] Padmaraju V, Indi SS, Rao KS. New evidences on Tau-DNA interactions and relevance to neurodegeneration. *Neurochem Int*. 2010;57(1):51-7.
- [52] Barrio JR, Kepe V, Satyamurthy N, Huang SC, Small G. Amyloid and tau imaging, neuronal losses and function in mild cognitive impairment. *The journal of nutrition, health & aging*. 2008;12(1):61S-5S.
- [53] Sambamurti K, Pappolla MA, Jagannatha Rao KS. Value in development of a TAPIR-like mouse monoclonal antibody to Abeta. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2008;14(2):175-7.
- [54] Utsuki T, Yu QS, Davidson D, Chen D, Holloway HW, Brossi A, et al. Identification of novel small molecule inhibitors of amyloid precursor protein synthesis as a route to lower Alzheimer's disease amyloid-beta peptide. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006;318(2):855-62.
- [55] Heredia L, Lin R, Vigo FS, Kedikian G, Busciglio J, Lorenzo A. Deposition of amyloid fibrils promotes cell-surface accumulation of amyloid beta precursor protein. *Neurobiology of disease*. 2004;16(3):617-29.
- [56] Sofi F, Macchi C, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Effectiveness of the Mediterranean diet: can it help delay or prevent Alzheimer's disease? *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2010;20(3):795-801.
- [57] Solfrizzi V, Capurso C, D'Introno A, Colacicco AM, Santamato A, Ranieri M, et al. Lifestyle-related factors in predementia and dementia syndromes. *Expert review of neurotherapeutics*. 2008;8(1):133-58.
- [58] Nehlig A. The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance. *British journal of clinical pharmacology*. 2013;75(3):716-27.
- [59] Kawas CH. Medications and diet: protective factors for AD? *Alzheimer disease and associated disorders*. 2006;20(3 Suppl 2):S89-96.
- [60] Luchsinger JA, Noble JM, Scarmeas N. Diet and Alzheimer's disease. *Current neurology and neuroscience reports*. 2007;7(5):366-72.
- [61] Calon F, Lim GP, Yang F, Morihara T, Teter B, Ubeda O, et al. Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron*. 2004;43(5):633-45.
- [62] Calon F, Cole G. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007;77(5-6):287-93.
- [63] Calon F. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Alzheimer's Disease: Key Questions and Partial Answers. *Current Alzheimer Research*. 2011;8:470-8.
- [64] Vauzour D. Effect of flavonoids on learning, memory and neurocognitive performance: relevance and potential implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014;94(6):1042-56.

- [65] Foltynie T, Kahan J. Parkinson's disease: an update on pathogenesis and treatment. *J Neurol*. 2013;260(5):1433-40.
- [66] Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, et al. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2008;23 Suppl 3:S548-59.
- [67] Aarsland D, Tandberg E, Larsen JP, Cummings JL. Frequency of dementia in parkinson disease. *Archives of Neurology*. 1996;53(6):538-42.
- [68] Korczyn AD, Reichmann H. Dementia with Lewy bodies. *Journal of the Neurological Sciences*. 2006;248(1-2):3-8.
- [69] Walker Z, Allen RL, Shergill S, Katona CL. Neuropsychological performance in Lewy body dementia and Alzheimer's disease. *The British Journal of Psychiatry*. 1997;170(2):156-8.
- [70] McKeith IG, Dickson DW, Lowe J, Emre M, O'Brien JT, Feldman H, et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology*. 2005;65(12):1863-72.
- [71] Boeve BF. Mild cognitive impairment associated with underlying Alzheimer's disease versus Lewy body disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2012;18:S41-S4.
- [72] Noyce AJ, Bestwick JP, Silveira-Moriyama L, Hawkes CH, Giovannoni G, Lees AJ, et al. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Annals of neurology*. 2012;72(6):893-901.
- [73] Van Maele-Fabry G, Hoet P, Vilain F, Lison D. Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Environment international*. 2012;46:30-43.
- [74] de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*. 2006;5(6):525-35.
- [75] Costa J, Lunet N, Santos C, Santos J, Vaz-Carneiro A. Caffeine exposure and the risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2010;20 Suppl 1:S221-38.
- [76] Connolly BS, Lang AE. Pharmacological treatment of parkinson disease: A review. *JAMA*. 2014;311(16):1670-83.
- [77] Bronstein JM, Tagliati M, Alterman RL, Lozano AM, Volkmann J, Stefani A, et al. Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues. *Arch Neurol*. 2011;68(2):165.
- [78] Grosso C, Valentão P, Ferreres F, Andrade P. The use of flavonoids in central nervous system disorders. *Curr Med Chem*. 2013;20(37):4694-719.
- [79] Blanchet J, Longpré F, Bureau G, Morissette M, DiPaolo T, Bronchti G, et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2008;32(5):1243-50.
- [80] Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, et al. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of Vaccinium Species. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1998;46(7):2686-93.
- [81] Goyarzu P, Malin DH, Lau FC, Taglialatela G, Moon WD, Jennings R, et al. Blueberry supplemented diet: effects on object recognition memory and nuclear factor-kappa B levels in aged rats. *Nutritional neuroscience*. 2004;7(2):75-83.
- [82] Coultrap SJ, Bickford PC, Browning MD. Blueberry-enriched diet ameliorates age-related declines in NMDA receptor-dependent LTP. *Age (Dordr)*. 2008;30(4):263-72.
- [83] Tan L, Yang HP, Pang W, Lu H, Hu YD, Li J, et al. Cyanidin-3-O-galactoside and Blueberry Extracts Supplementation Improves Spatial Memory and Regulates Hippocampal ERK Expression in Senescence-accelerated Mice. *Biomedical and environmental sciences : BES*. 2014;27(3):186-96.
- [84] Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, et al. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(18):8114-21.
- [85] Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of nutrition*. 2005;135(10):2299-304.

- [86] Martinez-Florez S, Gutierrez-Fernandez B, Sanchez-Campos S, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ. Quercetin attenuates nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide production in interleukin-1beta-activated rat hepatocytes. *The Journal of nutrition*. 2005;135(6):1359-65.
- [87] Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Prior RL, Cao G, Martin A, et al. Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(19):8047-55.
- [88] Shukitt-Hale B, Carey AN, Jenkins D, Rabin BM, Joseph JA. Beneficial effects of fruit extracts on neuronal function and behavior in a rodent model of accelerated aging. *Neurobiology of aging*. 2007;28(8):1187-94.
- [89] Shukitt-Hale B, Carey A, Simon L, Mark DA, Joseph JA. Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. *Nutrition*. 2006;22(3):295-302.
- [90] Shukitt-Hale B, Cheng V, Joseph JA. Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats. *Nutritional neuroscience*. 2009;12(3):135-40.
- [91] Shih PH, Chan YC, Liao JW, Wang MF, Yen GC. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2010;21(7):598-605.
- [92] Vogiatzoglou A, Mulligan AA, Luben RN, Lentjes MA, Heiss C, Kelm M, et al. Assessment of the dietary intake of total flavan-3-ols, monomeric flavan-3-ols, proanthocyanidins and theaflavins in the European Union. *The British journal of nutrition*. 2013:1-11.
- [93] Asha Devi S, Sagar Chandrasekar BK, Manjula KR, Ishii N. Grape seed proanthocyanidin lowers brain oxidative stress in adult and middle-aged rats. *Experimental gerontology*. 2011;46(11):958-64.
- [94] Balu M, Sangeetha P, Murali G, Panneerselvam C. Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: modulatory role of grape seed extract. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2005;23(6):501-7.
- [95] Devi A, Jolitha AB, Ishii N. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) and antioxidant defense in the brain of adult rats. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2006;12(4):BR124-9.
- [96] Rendeiro C, Vauzour D, Rattray M, Waffo-Teguo P, Merillon JM, Butler LT, et al. Dietary levels of pure flavonoids improve spatial memory performance and increase hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *PLoS one*. 2013;8(5):e63535.
- [97] van Praag H, Lucero MJ, Yeo GW, Stecker K, Heivand N, Zhao C, et al. Plant-derived flavanol (-)epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(22):5869-78.
- [98] Schroeter H, Bahia P, Spencer JP, Sheppard O, Rattray M, Cadenas E, et al. (-)Epicatechin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and up-regulates GluR2 in cortical neurons. *Journal of neurochemistry*. 2007;101(6):1596-606.
- [99] Spencer JP, Schroeter H, Kuhnle G, Srai SK, Tyrrell RM, Hahn U, et al. Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *The Biochemical journal*. 2001;354(Pt 3):493-500.
- [100] Huang Q, Wu LJ, Tashiro S, Gao HY, Onodera S, Ikejima T. (+)-Catechin, an ingredient of green tea, protects murine microglia from oxidative stress-induced DNA damage and cell cycle arrest. *Journal of pharmacological sciences*. 2005;98(1):16-24.
- [101] Vafeiadou K, Vauzour D, Lee HY, Rodriguez-Mateos A, Williams RJ, Spencer JP. The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2009;484(1):100-9.
- [102] Wang J, Varghese M, Ono K, Yamada M, Levine S, Tzavaras N, et al. Cocoa Extracts Reduce Oligomerization of Amyloid- $\beta$ : Implications for Cognitive Improvement in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2014;41(2):643-50.
- [103] Cuevas E, Limón D, Pérez-Severiano F, Díaz A, Ortega L, Zenteno E, et al. Antioxidant effects of Epicatechin on the hippocampal toxicity caused by Amyloid-beta 25-35 in rats. *European journal of pharmacology*. 2009;616(1-3):122-7.
- [104] Ejaz Ahmed M, Khan MM, Javed H, Vaibhav K, Khan A, Tabassum R, et al. Amelioration of cognitive impairment and neurodegeneration by catechin hydrate in rat model of streptozotocin-

- induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Neurochemistry International*. 2013;62(4):492-501.
- [105] Desideri G, Kwik-Urbe C, Grassi D, Necozone S, Ghiadoni L, Mastroiacovo D, et al. Benefits in Cognitive Function, Blood Pressure, and Insulin Resistance Through Cocoa Flavanol Consumption in Elderly Subjects With Mild Cognitive Impairment: The Cocoa, Cognition, and Aging (CoCoA) Study. *Hypertension*. 2012;60(3):794-801.
- [106] Ruan H, Yang Y, Zhu X, Wang X, Chen R. Neuroprotective effects of ( $\pm$ )-catechin against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *Neuroscience letters*. 2009;450(2):152-7.
- [107] Ruan H-l, Yang Y, Zhu X-n, Wang X-l, Chen R-z. Similar potency of catechin and its enantiomers in alleviating 1-methyl-4-phenylpyridinium ion cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011;63(9):1169-74.
- [108] Teixeira MDA, Souza CM, Menezes APF, Carmo MRS, Fonteles AA, Gurgel JP, et al. Catechin attenuates behavioral neurotoxicity induced by 6-OHDA in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2013;110(0):1-7.
- [109] Del Rio D, Costa LG, Lean ME, Crozier A. Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2010;20(1):1-6.
- [110] Wu X, Cao G, Prior RL. Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *The Journal of nutrition*. 2002;132(7):1865-71.
- [111] Barros D, Amaral OB, Izquierdo I, Geracitano L, do Carmo Bassols Raseira M, Henriques AT, et al. Behavioral and genoprotective effects of Vaccinium berries intake in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2006;84(2):229-34.
- [112] Cho J, Kang JS, Long PH, Jing J, Back Y, Chung KS. Antioxidant and memory enhancing effects of purple sweet potato anthocyanin and cordyceps mushroom extract. *Archives of pharmacal research*. 2003;26(10):821-5.
- [113] Ramirez MR, Izquierdo I, do Carmo Bassols Raseira M, Zuanazzi JA, Barros D, Henriques AT. Effect of lyophilised Vaccinium berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2005;52(6):457-62.
- [114] Shan Q, Lu J, Zheng Y, Li J, Zhou Z, Hu B, et al. Purple sweet potato color ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage and inflammation in aging mouse brain induced by d-galactose. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2009;2009:564737.
- [115] Papandreou MA, Dimakopoulou A, Linardaki ZI, Cordopatis P, Klimis-Zacas D, Margarity M, et al. Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. *Behavioural brain research*. 2009;198(2):352-8.
- [116] Rendeiro C, Vauzour D, Kean RJ, Butler LT, Rattray M, Spencer JP, et al. Blueberry supplementation induces spatial memory improvements and region-specific regulation of hippocampal BDNF mRNA expression in young rats. *Psychopharmacology*. 2012;223(3):319-30.
- [117] Rendeiro C, Foley A, Lau VC, Ring R, Rodriguez-Mateos A, Vauzour D, et al. A role for hippocampal PSA-NCAM and NMDA-NR2B receptor function in flavonoid-induced spatial memory improvements in young rats. *Neuropharmacology*. 2013;79C:335-44.
- [118] Lau FC, Bielinski DF, Joseph JA. Inhibitory effects of blueberry extract on the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-activated BV2 microglia. *Journal of neuroscience research*. 2007;85(5):1010-7.
- [119] Tarozzi A, Morroni F, Merlicco A, Bolondi C, Teti G, Falconi M, et al. Neuroprotective effects of cyanidin 3-O-glucopyranoside on amyloid beta (25–35) oligomer-induced toxicity. *Neuroscience letters*. 2010;473(2):72-6.
- [120] Hung T-C, Chang T-T, Fan M-J, Lee C-C, Chen CY-C. In Silico Insight into Potent of Anthocyanin Regulation of FKBP52 to Prevent Alzheimer's Disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014;2014:20.
- [121] Cao W, Konsolaki M. FKBP immunophilins and Alzheimer's disease: a chaperoned affair. *J Biosci*. 2011;36(3):493-8.
- [122] Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MRC, Marisco P, Agostinho P, Rodrigues M, et al. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life sciences*. 2014;96(1–2):7-17.

- [123] Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MRC, Rodrigues MV, Schmatz R, Pimentel VC, et al. Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. *Life sciences*. 2012;91(23–24):1221-8.
- [124] Strathearn KE, Yousef GG, Grace MH, Roy SL, Tambe MA, Ferruzzi MG, et al. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease. *Brain research*. 2014;1555(0):60-77.
- [125] Dreiseitel A, Korte G, Schreier P, Oehme A, Locher S, Domani M, et al. Berry anthocyanins and their aglycons inhibit monoamine oxidases A and B. *Pharmacological Research*. 2009;59(5):306-11.
- [126] Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5(6):493-506.
- [127] Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American journal of medicine*. 2002;113 Suppl 9B:71S-88S.
- [128] Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, et al. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and applied pharmacology*. 2007;224(3):274-83.
- [129] Shankar S, Singh G, Srivastava RK. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2007;12:4839-54.
- [130] King RE, Kent KD, Bomser JA. Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. *Chemico-biological interactions*. 2005;151(2):143-9.
- [131] Abraham J, Johnson RW. Consuming a diet supplemented with resveratrol reduced infection-related neuroinflammation and deficits in working memory in aged mice. *Rejuvenation research*. 2009;12(6):445-53.
- [132] Dal-Pan A, Pifferi F, Marchal J, Picq JL, Aujard F. Cognitive performances are selectively enhanced during chronic caloric restriction or resveratrol supplementation in a primate. *PloS one*. 2011;6(1):e16581.
- [133] Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003;425(6954):191-6.
- [134] Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*. 2006;127(6):1109-22.
- [135] Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B, et al. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes*. 2006;55(8):2180-91.
- [136] Csiszar A, Labinsky N, Pinto JT, Ballabh P, Zhang H, Losonczy G, et al. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2009;297(1):H13-20.
- [137] Gracia-Sancho J, Villarreal G, Jr., Zhang Y, Garcia-Cardena G. Activation of SIRT1 by resveratrol induces KLF2 expression conferring an endothelial vasoprotective phenotype. *Cardiovascular research*. 2010;85(3):514-9.
- [138] Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*. 2004;429(6993):771-6.
- [139] Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, et al. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell metabolism*. 2008;8(5):347-58.
- [140] Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, van Veen E, Czopik A, et al. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging cell*. 2007;6(6):759-67.
- [141] Banks AS, Kon N, Knight C, Matsumoto M, Gutierrez-Juarez R, Rossetti L, et al. Sirt1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell metabolism*. 2008;8(4):333-41.
- [142] Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschop MH. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(28):9793-8.

- [143] Pacholec M, Bleasdale JE, Chruncyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, et al. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(11):8340-51.
- [144] Dai H, Kustigian L, Carney D, Case A, Considine T, Hubbard BP, et al. SIRT1 activation by small molecules: kinetic and biophysical evidence for direct interaction of enzyme and activator. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(43):32695-703.
- [145] Chan AY, Dolinsky VW, Soltys CL, Viollet B, Baksh S, Light PE, et al. Resveratrol inhibits cardiac hypertrophy via AMP-activated protein kinase and Akt. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(35):24194-201.
- [146] Cao Z, Fang J, Xia C, Shi X, Jiang BH. trans-3,4,5'-Trihydroxystibene inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(15):5253-63.
- [147] Brito PM, Devillard R, Negre-Salvayre A, Almeida LM, Dinis TC, Salvayre R, et al. Resveratrol inhibits the mTOR mitogenic signaling evoked by oxidized LDL in smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2009;205(1):126-34.
- [148] Frojdo S, Cozzone D, Vidal H, Pirola L. Resveratrol is a class IA phosphoinositide 3-kinase inhibitor. *The Biochemical journal*. 2007;406(3):511-8.
- [149] Haider UG, Sorescu D, Griendling KK, Vollmar AM, Dirsch VM. Resveratrol suppresses angiotensin II-induced Akt/protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation and subsequent hypertrophy in rat aortic smooth muscle cells. *Molecular pharmacology*. 2002;62(4):772-7.
- [150] Medvedik O, Lamming DW, Kim KD, Sinclair DA. MSN2 and MSN4 link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS biology*. 2007;5(10):e261.
- [151] Blagosklonny MV. An anti-aging drug today: from senescence-promoting genes to anti-aging pill. *Drug discovery today*. 2007;12(5-6):218-24.
- [152] Han YS, Bastianetto S, Dumont Y, Quirion R. Specific plasma membrane binding sites for polyphenols, including resveratrol, in the rat brain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006;318(1):238-45.
- [153] Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological reviews*. 2004;56(3):387-437.
- [154] Khanduja KL, Bhardwaj A, Kaushik G. Resveratrol inhibits N-nitrosodiethylamine-induced ornithine decarboxylase and cyclooxygenase in mice. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2004;50(1):61-5.
- [155] Aziz MH, Afaq F, Ahmad N. Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in survivin. *Photochemistry and photobiology*. 2005;81(1):25-31.
- [156] Afaq F, Adhami VM, Ahmad N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicology and applied pharmacology*. 2003;186(1):28-37.
- [157] Shigematsu S, Ishida S, Hara M, Takahashi N, Yoshimatsu H, Sakata T, et al. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia/reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants. *Free radical biology & medicine*. 2003;34(7):810-7.
- [158] Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *Journal of immunology*. 2000;164(12):6509-19.
- [159] Holmes-McNary M, Baldwin AS, Jr. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the IkkappaB kinase. *Cancer research*. 2000;60(13):3477-83.
- [160] Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO journal*. 2004;23(12):2369-80.
- [161] Chen G, Shan W, Wu Y, Ren L, Dong J, Ji Z. Synthesis and anti-inflammatory activity of resveratrol analogs. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2005;53(12):1587-90.

- [162] Adler AS, Sinha S, Kawahara TL, Zhang JY, Segal E, Chang HY. Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. *Genes & development*. 2007;21(24):3244-57.
- [163] Adler AS, Kawahara TL, Segal E, Chang HY. Reversal of aging by NFkappaB blockade. *Cell Cycle*. 2008;7(5):556-9.
- [164] Rotondo S, Rajtar G, Manarini S, Celardo A, Rutilo D, de Gaetano G, et al. Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *British journal of pharmacology*. 1998;123(8):1691-9.
- [165] Jang DS, Kang BS, Ryu SY, Chang IM, Min KR, Kim Y. Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. *Biochemical pharmacology*. 1999;57(6):705-12.
- [166] Surh YJ, Hurh YJ, Kang JY, Lee E, Kong G, Lee SJ. Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer letters*. 1999;140(1-2):1-10.
- [167] Martinez J, Moreno JJ. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochemical pharmacology*. 2000;59(7):865-70.
- [168] Moreno JJ. Resveratrol modulates arachidonic acid release, prostaglandin synthesis, and 3T6 fibroblast growth. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2000;294(1):333-8.
- [169] Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y. Protective effect of resveratrol on oxidative damage in male and female stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2001;28(1-2):55-9.
- [170] Floreani M, Napoli E, Quintieri L, Palatini P. Oral administration of trans-resveratrol to guinea pigs increases cardiac DT-diaphorase and catalase activities, and protects isolated atria from menadione toxicity. *Life sciences*. 2003;72(24):2741-50.
- [171] Robb EL, Winkelmoen L, Visanji N, Brotchie J, Stuart JA. Dietary resveratrol administration increases MnSOD expression and activity in mouse brain. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;372(1):254-9.
- [172] Chu LM, Lassaletta AD, Robich MP, Sellke FW. Resveratrol in the prevention and treatment of coronary artery disease. *Current atherosclerosis reports*. 2011;13(6):439-46.
- [173] Sakata Y, Zhuang H, Kwansa H, Koehler RC, Dore S. Resveratrol protects against experimental stroke: putative neuroprotective role of heme oxygenase 1. *Experimental neurology*. 2010;224(1):325-9.
- [174] Corder R, Crozier A, Koon PA. Drinking your health? It's too early to say. *Nature*. 2003;426(6963):119.
- [175] Ramassamy C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European journal of pharmacology*. 2006;545(1):51-64.
- [176] Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, Fischer A, Sananbenesi F, Rodgers JT, et al. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *The EMBO journal*. 2007;26(13):3169-79.
- [177] Karuppagounder SS, Pinto JT, Xu H, Chen H-L, Beal MF, Gibson GE. Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*. 2009;54(2):111-8.
- [178] Marambaud P, Zhao H, Davies P. Resveratrol Promotes Clearance of Alzheimer's Disease Amyloid-beta Peptides. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(45):37377-82.
- [179] Wang J, Santa-Maria I, Ho L, Ksiezak-Reding H, Ono K, Teplow DB, et al. Grape Derived Polyphenols Attenuate Tau Neuropathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010;22(2):653-61.
- [180] Wang J, Bi W, Cheng A, Freire D, Vempati P, Zhao W, et al. Targeting multiple pathogenic mechanisms with polyphenols for the treatment of Alzheimer's disease-experimental approach and therapeutic implications. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2014;6(42).
- [181] Dal-Pan A, Julien C, Pierrisnard C, Tremblay C, Calon F. Resveratrol and, to a lesser extent, docosahexaenoic acid, induce disease-modifying effects in old 3xTg-AD mice. 24th Alzheimer's Association International Conference (Vancouver, Canada)2014.
- [182] Okawara M, Katsuki H, Kurimoto E, Shibata H, Kume T, Akaike A. Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults. *Biochemical pharmacology*. 2007;73(4):550-60.



- [183] Lu K-T, Ko M-C, Chen B-Y, Huang J-C, Hsieh C-W, Lee M-C, et al. Neuroprotective Effects of Resveratrol on MPTP-Induced Neuron Loss Mediated by Free Radical Scavenging. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(16):6910-3.
- [184] Albani D, Polito L, Batelli S, De Mauro S, Fracasso C, Martelli G, et al. 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. *Journal of neurochemistry*. 2009;110(5):1445-56.
- [185] Virmani A, Pinto L, Binienda Z, Ali S. Food, Nutrigenomics, and Neurodegeneration—Neuroprotection by What You Eat! *Molecular neurobiology*. 2013;48:353-62.
- [186] Abd El Mohsen MM, Kuhnle G, Rechner AR, Schroeter H, Rose S, Jenner P, et al. Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free radical biology & medicine*. 2002;33(12):1693-702.
- [187] Prasain JK, Peng N, Dai Y, Moore R, Arabshahi A, Wilson L, et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry identification of proanthocyanidins in rat plasma after oral administration of grape seed extract. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2009;16(2-3):233-43.
- [188] Ferruzzi MG, Lobo JK, Janle EM, Cooper B, Simon JE, Wu QL, et al. Bioavailability of gallic acid and catechins from grape seed polyphenol extract is improved by repeated dosing in rats: implications for treatment in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2009;18(1):113-24.
- [189] Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free radical biology & medicine*. 2004;36(5):592-604.
- [190] Passamonti S, Vrhovsek U, Vanzo A, Mattivi F. Fast access of some grape pigments to the brain. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(18):7029-34.
- [191] Kalt W, Blumberg JB, McDonald JE, Vinqvist-Tymchuk MR, Fillmore SA, Graf BA, et al. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(3):705-12.
- [192] Milbury PE, Kalt W. Xenobiotic metabolism and berry flavonoid transport across the blood-brain barrier. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(7):3950-6.
- [193] El Mohsen MA, Marks J, Kuhnle G, Moore K, Debnam E, Kaila Srai S, et al. Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats. *The British journal of nutrition*. 2006;95(1):51-8.
- [194] Borges G, Roowi S, Rouanet JM, Duthie GG, Lean ME, Crozier A. The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats. *Molecular nutrition & food research*. 2007;51(6):714-25.
- [195] Asensi M, Medina I, Ortega A, Carretero J, Bano MC, Obrador E, et al. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free radical biology & medicine*. 2002;33(3):387-98.
- [196] Wang Q, Xu J, Rottinghaus GE, Simonyi A, Lubahn D, Sun GY, et al. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain research*. 2002;958(2):439-47.
- [197] Abd El-Mohsen M, Bayele H, Kuhnle G, Gibson G, Debnam E, Kaila Srai S, et al. Distribution of [<sup>3</sup>H]trans-resveratrol in rat tissues following oral administration. *The British journal of nutrition*. 2006;96(1):62-70.
- [198] Juan ME, Maijo M, Planas JM. Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2010;51(2):391-8.
- [199] Spencer JP, Abd El Mohsen MM, Minihane AM, Mathers JC. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *The British journal of nutrition*. 2008;99(1):12-22.





## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



A

- Abd El-Mohsen, M., Bayele, H., Kuhnle, G., Gibson, G., Debnam, E., Kaila Srari, S., Rice-Evans, C., and Spencer, J.P. (2006). Distribution of [3H]trans-resveratrol in rat tissues following oral administration. *Br J Nutr* 96, 62-70.
- Abd El Mohsen, M.M., Kuhnle, G., Rechner, A.R., Schroeter, H., Rose, S., Jenner, P., and Rice-Evans, C.A. (2002). Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radic Biol Med* 33, 1693-1702.
- Abraham, J., and Johnson, R.W. (2009). Consuming a diet supplemented with resveratrol reduced infection-related neuroinflammation and deficits in working memory in aged mice. *Rejuvenation Res* 12, 445-453. doi: 10.1089/rej.2009.0888.
- Abrahams, S., Pickering, A., Polkey, C.E., and Morris, R.G. (1997). Spatial memory deficits in patients with unilateral damage to the right hippocampal formation. *Neuropsychologia* 35, 11-24.
- Abrous, D.N., Koehl, M., and Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85, 523-569. doi: 10.1152/physrev.00055.2003.
- Adler, A.S., Kawahara, T.L., Segal, E., and Chang, H.Y. (2008). Reversal of aging by NFkappaB blockade. *Cell Cycle* 7, 556-559.
- Adler, A.S., Sinha, S., Kawahara, T.L., Zhang, J.Y., Segal, E., and Chang, H.Y. (2007). Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. *Genes Dev* 21, 3244-3257. doi: 10.1101/gad.1588507.
- Adlercreutz, H., Honjo, H., Higashi, A., Fotsis, T., Hamalainen, E., Hasegawa, T., and Okada, H. (1991). Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am J Clin Nutr* 54, 1093-1100.
- Afaq, F., Adhami, V.M., and Ahmad, N. (2003). Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 186, 28-37.
- Agarwal, B., and Baur, J.A. (2011). Resveratrol and life extension. *Ann N Y Acad Sci* 1215, 138-143. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05850.x.
- Aimone, J.B., Li, Y., Lee, S.W., Clemenson, G.D., Deng, W., and Gage, F.H. (2014). Regulation and Function of Adult Neurogenesis: From Genes to Cognition. *Physiol Rev* 94, 991-1026. doi: 10.1152/physrev.00004.2014.
- Aimone, J.B., Wiles, J., and Gage, F.H. (2006). Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci* 9, 723-727. doi: 10.1038/nn1707.
- Allen, S.J., and Dawbarn, D. (2006). Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin Sci (Lond)* 110, 175-191. doi: 10.1042/CS20050161.
- Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135, 1127-1128.
- Alvarez, V.A., and Sabatini, B.L. (2007). Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 30, 79-97. doi: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094222.
- Ambrogini, P., Cuppini, R., Cuppini, C., Ciaroni, S., Cecchini, T., Ferri, P., Sartini, S., and Del Grande, P. (2000). Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 286, 21-24.

- Ambrogini, P., Orsini, L., Mancini, C., Ferri, P., Ciaroni, S., and Cuppini, R. (2004). Learning may reduce neurogenesis in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 359, 13-16. doi: 10.1016/j.neulet.2003.12.123.
- An, J.J., Gharami, K., Liao, G.Y., Woo, N.H., Lau, A.G., Vanevski, F., Torre, E.R., Jones, K.R., Feng, Y., Lu, B., and Xu, B. (2008). Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell* 134, 175-187. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.045.
- Andres-Lacueva, C., Shukitt-Hale, B., Galli, R.L., Jauregui, O., Lamuela-Raventos, R.M., and Joseph, J.A. (2005). Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr Neurosci* 8, 111-120.
- Araujo, J.A., Landsberg, G.M., Milgram, N.W., and Miolo, A. (2008). Improvement of short-term memory performance in aged beagles by a nutraceutical supplement containing phosphatidylserine, Ginkgo biloba, vitamin E, and pyridoxine. *Can Vet J* 49, 379-385.
- Asensi, M., Medina, I., Ortega, A., Carretero, J., Bano, M.C., Obrador, E., and Estrela, J.M. (2002). Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic Biol Med* 33, 387-398.
- Asha Devi, S., Sagar Chandrasekar, B.K., Manjula, K.R., and Ishii, N. (2011). Grape seed proanthocyanidin lowers brain oxidative stress in adult and middle-aged rats. *Exp Gerontol* 46, 958-964. doi: 10.1016/j.exger.2011.08.006.
- Athar, M., Back, J.H., Tang, X., Kim, K.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R., and Kim, A.L. (2007). Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol* 224, 274-283. doi: 10.1016/j.taap.2006.12.025.
- Atkinson, C., Skor, H.E., Fitzgibbons, E.D., Scholes, D., Chen, C., Wahala, K., Schwartz, S.M., and Lampe, J.W. (2002). Overnight urinary isoflavone excretion in a population of women living in the United States, and its relationship to isoflavone intake. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11, 253-260.
- Aziz, M.H., Afaq, F., and Ahmad, N. (2005). Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in survivin. *Photochem Photobiol* 81, 25-31. doi: 10.1562/2004-08-13-RA-274.

## **B**

- Bach, M.E., Barad, M., Son, H., Zhuo, M., Lu, Y.F., Shih, R., Mansuy, I., Hawkins, R.D., and Kandel, E.R. (1999). Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5280-5285.
- Balu, M., Sangeetha, P., Murali, G., and Panneerselvam, C. (2005). Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: modulatory role of grape seed extract. *Int J Dev Neurosci* 23, 501-507. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2005.06.001.
- Banks, A.S., Kon, N., Knight, C., Matsumoto, M., Gutierrez-Juarez, R., Rossetti, L., Gu, W., and Accili, D. (2008). SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab* 8, 333-341. doi: 10.1016/j.cmet.2008.08.014.

- Barco, A., Bailey, C.H., and Kandel, E.R. (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem* 97, 1520-1533. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03870.x.
- Barger, J.L., Kayo, T., Vann, J.M., Arias, E.B., Wang, J., Hacker, T.A., Wang, Y., Raederstorff, D., Morrow, J.D., Leeuwenburgh, C., Allison, D.B., Saupe, K.W., Cartee, G.D., Weindruch, R., and Prolla, T.A. (2008). A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS One* 3, e2264. doi: 10.1371/journal.pone.0002264.
- Barnabe-Heider, F., and Miller, F.D. (2003). Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci* 23, 5149-5160.
- Barnes, C.A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93, 74-104.
- Barnes, C.A., and McNaughton, B.L. (1985). An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses. *Behav Neurosci* 99, 1040-1048.
- Barnes, C.A., Rao, G., Foster, T.C., and McNaughton, B.L. (1992). Region-specific age effects on AMPA sensitivity: electrophysiological evidence for loss of synaptic contacts in hippocampal field CA1. *Hippocampus* 2, 457-468. doi: 10.1002/hipo.450020413.
- Barros, D., Amaral, O.B., Izquierdo, I., Geracitano, L., Do Carmo Bassols Raseira, M., Henriques, A.T., and Ramirez, M.R. (2006). Behavioral and genoprotective effects of Vaccinium berries intake in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 84, 229-234. doi: 10.1016/j.pbb.2006.05.001.
- Bartus, R.T. (2000). On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol* 163, 495-529. doi: 10.1006/exnr.2000.7397.
- Bath, K.G., Schilit, A., and Lee, F.S. (2013). Stress effects on BDNF expression: effects of age, sex, and form of stress. *Neuroscience* 239, 149-156. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.074.
- Baur, J.A., and Sinclair, D.A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5, 493-506. doi: 10.1038/nrd2060.
- Bennetau-Pelissero, C. (2001). Les phyto-oestrogènes dans l'alimentation et la thérapie: discussion. *Cah Nutr Diet*;36:25-38.
- Beracochea, D., Philippin, J.N., Meunier, S., Morain, P., and Bernard, K. (2007). Improvement of episodic contextual memory by S 18986 in middle-aged mice: comparison with donepezil. *Psychopharmacology (Berl)* 193, 63-73. doi: 10.1007/s00213-007-0765-4.
- Bevins, R.A., and Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* 1, 1306-1311. doi: 10.1038/nprot.2006.205.
- Bizon, J.L., and Gallagher, M. (2003). Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur J Neurosci* 18, 215-219.



- Bizon, J.L., Lee, H.J., and Gallagher, M. (2004). Neurogenesis in a rat model of age-related cognitive decline. *Aging Cell* 3, 227-234. doi: 10.1111/j.1474-9728.2004.00099.x.
- Blagosklonny, M.V. (2007). An anti-aging drug today: from senescence-promoting genes to anti-aging pill. *Drug Discov Today* 12, 218-224. doi: 10.1016/j.drudis.2007.01.004.
- Bliss, T.V., and Cooke, S.F. (2011). Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective. *Clinics (Sao Paulo)* 66 Suppl 1, 3-17.
- Bliss, T.V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 331-356.
- Bondareff, W., and Geinisman, Y. (1976). Loss of synapses in the dentate gyrus of the senescent rat. *Am J Anat* 145, 129-136. doi: 10.1002/aja.1001450110.
- Bordone, L., Cohen, D., Robinson, A., Motta, M.C., Van Veen, E., Czopik, A., Steele, A.D., Crowe, H., Marmor, S., Luo, J., Gu, W., and Guarente, L. (2007). SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* 6, 759-767. doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00335.x.
- Borges, G., Roowi, S., Rouanet, J.M., Duthie, G.G., Lean, M.E., and Crozier, A. (2007). The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats. *Mol Nutr Food Res* 51, 714-725. doi: 10.1002/mnfr.200700024.
- Boucheron, C., Alfos, S., Enderlin, V., Husson, M., Pallet, V., Jaffard, R., and Huguere, P. (2006). Age-related effects of ethanol consumption on triiodothyronine and retinoic acid nuclear receptors, neurogranin and neuromodulin expression levels in mouse brain. *Neurobiol Aging* 27, 1326-1334. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.07.008.
- Boutet, I., Ryan, M., Kulaga, V., Mcshane, C., Christie, L.A., Freedman, M., and Milgram, N.W. (2005). Age-associated cognitive deficits in humans and dogs: a comparative neuropsychological approach. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29, 433-441. doi: 10.1016/j.pnpbp.2004.12.015.
- Bramham, C.R., and Messaoudi, E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 76, 99-125. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.06.003.
- Bramham, C.R., and Wells, D.G. (2007). Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* 8, 776-789. doi: 10.1038/nrn2150.
- Brito, P.M., Devillard, R., Negre-Salvayre, A., Almeida, L.M., Dinis, T.C., Salvayre, R., and Auge, N. (2009). Resveratrol inhibits the mTOR mitogenic signaling evoked by oxidized LDL in smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 205, 126-134. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.11.011.
- Brody, D.L., and Holtzman, D.M. (2006). Morris water maze search strategy analysis in PDAPP mice before and after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 197, 330-340. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.10.020.
- Buffalo, E.A., Bellgowan, P.S., and Martin, A. (2006). Distinct roles for medial temporal lobe structures in memory for objects and their locations. *Learn Mem* 13, 638-643. doi: 10.1101/lm.251906.
- Burke, S.N., and Barnes, C.A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 7, 30-40. doi: 10.1038/nrn1809.

Burke, S.N., and Barnes, C.A. (2010). Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends Neurosci* 33, 153-161. doi: 10.1016/j.tins.2009.12.003.

## C

Calabrese, F., Guidotti, G., Racagni, G., and Riva, M.A. (2013). Reduced neuroplasticity in aged rats: a role for the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor. *Neurobiol Aging* 34, 2768-2776. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.014.

Calabrese, F., Molteni, R., Racagni, G., and Riva, M.A. (2009). Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1, S208-216. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.05.014.

Calhoun, M.E., Kurth, D., Phinney, A.L., Long, J.M., Hengemihle, J., Mouton, P.R., Ingram, D.K., and Jucker, M. (1998). Hippocampal neuron and synaptophysin-positive bouton number in aging C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging* 19, 599-606.

Cameron, H.A., and McKay, R.D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435, 406-417.

Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., and Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56, 337-344.

Cao, Z., Fang, J., Xia, C., Shi, X., and Jiang, B.H. (2004). trans-3,4,5'-Trihydroxystibene inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 10, 5253-5263. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0588.

Carew, T.J. (1996). Molecular enhancement of memory formation. *Neuron* 16, 5-8.

Carey, A.N., Gomes, S.M., and Shukitt-Hale, B. (2014). Blueberry Supplementation Improves Memory in Middle-Aged Mice Fed a High-Fat Diet. *J Agric Food Chem*. doi: 10.1021/jf404565s.

Carlezon, W.A., Jr., Duman, R.S., and Nestler, E.J. (2005). The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28, 436-445. doi: 10.1016/j.tins.2005.06.005.

Casoli, T., Di Stefano, G., Gracciotti, N., Fattoretti, P., Solazzi, M., and Bertoni-Freddari, C. (2001). Age-related effects of moderate alcohol consumption on GAP-43 levels in rat hippocampus. *Mech Ageing Dev* 122, 1723-1738.

Cassel, J.C., Duconseille, E., Jeltsch, H., and Will, B. (1997). The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: a review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog Neurobiol* 51, 663-716.

Chan, A.Y., Dolinsky, V.W., Soltys, C.L., Viollet, B., Baksh, S., Light, P.E., and Dyck, J.R. (2008). Resveratrol inhibits cardiac hypertrophy via AMP-activated protein kinase and Akt. *J Biol Chem* 283, 24194-24201. doi: 10.1074/jbc.M802869200.

Chao, M.V., Rajagopal, R., and Lee, F.S. (2006). Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond)* 110, 167-173. doi: 10.1042/CS20050163.

Chen, G., Shan, W., Wu, Y., Ren, L., Dong, J., and Ji, Z. (2005). Synthesis and anti-inflammatory activity of resveratrol analogs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 53, 1587-1590.

Chen, Z., Zheng, W., Custer, L.J., Dai, Q., Shu, X.O., Jin, F., and Franke, A.A. (1999). Usual dietary consumption of soy foods and its correlation with the excretion rate of

- isoflavonoids in overnight urine samples among Chinese women in Shanghai. *Nutr Cancer* 33, 82-87. doi: 10.1080/01635589909514752.
- Cho, J., Kang, J.S., Long, P.H., Jing, J., Back, Y., and Chung, K.S. (2003). Antioxidant and memory enhancing effects of purple sweet potato anthocyanin and cordyceps mushroom extract. *Arch Pharm Res* 26, 821-825.
- Cho, Y.H., Giese, K.P., Tanila, H., Silva, A.J., and Eichenbaum, H. (1998). Abnormal hippocampal spatial representations in alphaCaMKII $\alpha$  and CREB $\alpha$ Delta-mice. *Science* 279, 867-869.
- Christie, B.R., and Cameron, H.A. (2006). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus* 16, 199-207. doi: 10.1002/hipo.20151.
- Christie, L.A., Studzinski, C.M., Araujo, J.A., Leung, C.S., Ikeda-Douglas, C.J., Head, E., Cotman, C.W., and Milgram, N.W. (2005). A comparison of egocentric and allocentric age-dependent spatial learning in the beagle dog. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29, 361-369. doi: 10.1016/j.pnpbp.2004.12.002.
- Chu, L.M., Lassaletta, A.D., Robich, M.P., and Sellke, F.W. (2011). Resveratrol in the prevention and treatment of coronary artery disease. *Curr Atheroscler Rep* 13, 439-446. doi: 10.1007/s11883-011-0202-3.
- Clark, R.E., Zola, S.M., and Squire, L.R. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci* 20, 8853-8860.
- Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G.D., Jr., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., and Bussey, T.J. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325, 210-213. doi: 10.1126/science.1173215.
- Clifford, M.N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric*;80:1033-43.
- Coleman, M. (2005). Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci* 6, 889-898. doi: 10.1038/nrn1788.
- Colle, M.A., Duyckaerts, C., Laquerriere, A., Pradier, L., Czech, C., Checler, F., and Hauw, J.J. (2000). Laminar specific loss of isocortical presenilin 1 immunoreactivity in Alzheimer's disease. Correlations with the amyloid load and the density of tau-positive neurofibrillary tangles. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26, 117-123.
- Collin, S., and Crouzet, J. (2011). *Polyphénols et procédés : transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agroalimentaire*. Lavoisier.
- Conkright, M.D., Guzman, E., Flechner, L., Su, A.I., Hogenesch, J.B., and Montminy, M. (2003). Genome-wide analysis of CREB target genes reveals a core promoter requirement for cAMP responsiveness. *Mol Cell* 11, 1101-1108.
- Corder, R., Crozier, A., and Kroon, P.A. (2003). Drinking your health? It's too early to say. *Nature* 426, 119. doi: 10.1038/426119d.
- Coultrap, S.J., Bickford, P.C., and Browning, M.D. (2008). Blueberry-enriched diet ameliorates age-related declines in NMDA receptor-dependent LTP. *Age (Dordr)* 30, 263-272. doi: 10.1007/s11357-008-9067-y.

- Coward, L., Barnes, N.C., Setchell, K.D.R., and Barnes, S. (1993). Genistein, daidzein, and their beta-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem*;41:1961-7.
- Csiszar, A., Labinsky, N., Pinto, J.T., Ballabh, P., Zhang, H., Losonczy, G., Pearson, K., De Cabo, R., Pacher, P., Zhang, C., and Ungvari, Z. (2009). Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H13-20. doi: 10.1152/ajpheart.00368.2009.
- Cummings, B.J., Su, J.H., Cotman, C.W., White, R., and Russell, M.J. (1993). Beta-amyloid accumulation in aged canine brain: a model of early plaque formation in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 14, 547-560.

## D

- D'hooge, R., and 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.
- Dai, H., Kustigian, L., Carney, D., Case, A., Considine, T., Hubbard, B.P., Perni, R.B., Riera, T.V., Szczepankiewicz, B., Vlasuk, G.P., and Stein, R.L. (2010). SIRT1 activation by small molecules: kinetic and biophysical evidence for direct interaction of enzyme and activator. *J Biol Chem* 285, 32695-32703. doi: 10.1074/jbc.M110.133892.
- Dairin, F. (1996). Bien-fondé de la mise en place d'une consultation spécialisée chez le chien âgé. *Gériatrie Canine et Féline*, 17-21.
- Dal-Pan, A., Pifferi, F., Marchal, J., Picq, J.L., and Aujard, F. (2011a). Cognitive performances are selectively enhanced during chronic caloric restriction or resveratrol supplementation in a primate. *PLoS One* 6, e16581. doi: 10.1371/journal.pone.0016581.
- Dal-Pan, A., Terrien, J., Pifferi, F., Botalla, R., Hardy, I., Marchal, J., Zahariev, A., Chery, I., Zizzari, P., Perret, M., Picq, J.L., Epelbaum, J., Blanc, S., and Aujard, F. (2011b). Caloric restriction or resveratrol supplementation and ageing in a non-human primate: first-year outcome of the RESTRIKAL study in *Microcebus murinus*. *Age (Dordr)* 33, 15-31. doi: 10.1007/s11357-010-9156-6.
- Dayer, A.G., Ford, A.A., Cleaver, K.M., Yassaee, M., and Cameron, H.A. (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 460, 563-572. doi: 10.1002/cne.10675.
- De Fiebre, N.C., Sumien, N., Forster, M.J., and De Fiebre, C.M. (2006). Spatial learning and psychomotor performance of C57BL/6 mice: age sensitivity and reliability of individual differences. *Age (Dordr)* 28, 235-253. doi: 10.1007/s11357-006-9027-3.
- De Hoz, L., Moser, E.I., and Morris, R.G. (2005). Spatial learning with unilateral and bilateral hippocampal networks. *Eur J Neurosci* 22, 745-754. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04255.x.
- De Nicolo, S., Tarani, L., Ceccanti, M., Maldini, M., Natella, F., Vania, A., Chaldakov, G.N., and Fiore, M. (2013). Effects of olive polyphenols administration on nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the mouse brain. *Nutrition* 29, 681-687. doi: 10.1016/j.nut.2012.11.007.

- Dean, R.L., 3rd, Scozzafava, J., Goas, J.A., Regan, B., Beer, B., and Bartus, R.T. (1981). Age-related differences in behavior across the life span of the C57BL/6J mouse. *Exp Aging Res* 7, 427-451. doi: 10.1080/03610738108259823.
- Del Rio, D., Costa, L.G., Lean, M.E., and Crozier, A. (2010). Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20, 1-6. doi: 10.1016/j.numecd.2009.05.015.
- Deng, W., Aimone, J.B., and Gage, F.H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11, 339-350. doi: 10.1038/nrn2822.
- Dere, E., Huston, J.P., and De Souza Silva, M.A. (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 31, 673-704. doi: 10.1016/j.neubiorev.2007.01.005.
- Deupree, D.L., Turner, D.A., and Watters, C.L. (1991). Spatial performance correlates with in vitro potentiation in young and aged Fischer 344 rats. *Brain Res* 554, 1-9.
- Devi, A., Jolitha, A.B., and Ishii, N. (2006). Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) and antioxidant defense in the brain of adult rats. *Med Sci Monit* 12, BR124-129.
- Dias, A.S., Porawski, M., Alonso, M., Marroni, N., Collado, P.S., and Gonzalez-Gallego, J. (2005). Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* 135, 2299-2304.
- Dickstein, D.L., Kabaso, D., Rocher, A.B., Luebke, J.I., Wearne, S.L., and Hof, P.R. (2007). Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell* 6, 275-284. doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00289.x.
- Dinges, D.F. (2006). Cocoa flavanols, cerebral blood flow, cognition, and health: going forward. *J Cardiovasc Pharmacol* 47 Suppl 2, S221-223.
- Dobrossy, M.D., Drapeau, E., Aurousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.V., and Abrous, D.N. (2003). Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol Psychiatry* 8, 974-982. doi: 10.1038/sj.mp.4001419.
- Dodart, J.C., Mathis, C., and Ungerer, A. (1997). Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. *Neuroreport* 8, 1173-1178.
- Drake, C.T., Milner, T.A., and Patterson, S.L. (1999). Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci* 19, 8009-8026.
- Drapeau, E., Mayo, W., Aurousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.V., and Abrous, D.N. (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14385-14390. doi: 10.1073/pnas.2334169100.
- Drapeau, E., and Nora Abrous, D. (2008). Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell* 7, 569-589. doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00369.x.
- Drever, B.D., Riedel, G., and Platt, B. (2011). The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav Brain Res* 221, 505-514. doi: 10.1016/j.bbr.2010.11.037.

- Driscoll, I., Howard, S.R., Stone, J.C., Monfils, M.H., Tomanek, B., Brooks, W.M., and Sutherland, R.J. (2006). The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience* 139, 1173-1185. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.01.040.
- Dumas, T.C., and Foster, T.C. (1995). Developmental increase in CA3-CA1 presynaptic function in the hippocampal slice. *J Neurophysiol* 73, 1821-1828.
- Dupret, D., Revest, J.M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N., and Piazza, P.V. (2008). Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3, e1959. doi: 10.1371/journal.pone.0001959.

## **E**

- Eichenbaum, H. (1992). The hippocampal system and declarative memory in animals. *J Cogn Neurosci* 4, 217-231. doi: 10.1162/jocn.1992.4.3.217.
- Eichenbaum, H., and Cohen, N.J. (1988). Representation in the hippocampus: what do hippocampal neurons code? *Trends Neurosci* 11, 244-248.
- Eichenbaum, H., Stewart, C., and Morris, R.G. (1990). Hippocampal representation in place learning. *J Neurosci* 10, 3531-3542.
- El Mohsen, M.A., Marks, J., Kuhnle, G., Moore, K., Debnam, E., Kaila Srai, S., Rice-Evans, C., and Spencer, J.P. (2006). Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats. *Br J Nutr* 95, 51-58.
- Ennaceur, A., and Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31, 47-59.
- Epp, J.R., Haack, A.K., and Galea, L.A. (2010). Task difficulty in the Morris water task influences the survival of new neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus* 20, 866-876. doi: 10.1002/hipo.20692.
- Erickson, C.A., and Barnes, C.A. (2003). The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp Gerontol* 38, 61-69.
- Erlund, I., Silaste, M.L., Alfthan, G., Rantala, M., Kesaniemi, Y.A., and Aro, A. (2002). Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *Eur J Clin Nutr* 56, 891-898. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601409.
- Esposito, E., Rotilio, D., Di Matteo, V., Di Giulio, C., Cacchio, M., and Algeri, S. (2002). A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol Aging* 23, 719-735.
- Etchamendy, N., Desmedt, A., Cortes-Torrea, C., Marighetto, A., and Jaffard, R. (2003). Hippocampal lesions and discrimination performance of mice in the radial maze: sparing or impairment depending on the representational demands of the task. *Hippocampus* 13, 197-211. doi: 10.1002/hipo.10055.
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Vouimba, R.M., Pallet, V., Jaffard, R., and Higuieret, P. (2001). Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J Neurosci* 21, 6423-6429.

Evans, D.A., Funkenstein, H.H., Albert, M.S., Scherr, P.A., Cook, N.R., Chown, M.J., Hebert, L.E., Hennekens, C.H., and Taylor, J.O. (1989). Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* 262, 2551-2556.

## *F*

- Fahlstrom, A., Yu, Q., and Ulfhake, B. (2011). Behavioral changes in aging female C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging* 32, 1868-1880. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.11.003.
- Feart, C., Mingaud, F., Enderlin, V., Husson, M., Alfos, S., Higuieret, P., and Pallet, V. (2005). Differential effect of retinoic acid and triiodothyronine on the age-related hypo-expression of neurogranin in rat. *Neurobiol Aging* 26, 729-738. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.06.004.
- Feige, J.N., Lagouge, M., Canto, C., Strehle, A., Houten, S.M., Milne, J.C., Lambert, P.D., Matak, C., Elliott, P.J., and Auwerx, J. (2008). Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab* 8, 347-358. doi: 10.1016/j.cmet.2008.08.017.
- Ferruzzi, M.G., Lobo, J.K., Janle, E.M., Cooper, B., Simon, J.E., Wu, Q.L., Welch, C., Ho, L., Weaver, C., and Pasinetti, G.M. (2009). Bioavailability of gallic acid and catechins from grape seed polyphenol extract is improved by repeated dosing in rats: implications for treatment in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 18, 113-124. doi: 10.3233/JAD-2009-1135.
- Figurov, A., Pozzo-Miller, L.D., Olafsson, P., Wang, T., and Lu, B. (1996). Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature* 381, 706-709. doi: 10.1038/381706a0.
- Finkbeiner, S. (2000). CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron* 25, 11-14.
- Finkbeiner, S., Tavazoie, S.F., Maloratsky, A., Jacobs, K.M., Harris, K.M., and Greenberg, M.E. (1997). CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19, 1031-1047.
- Fischer, W., Bjorklund, A., Chen, K., and Gage, F.H. (1991). NGF improves spatial memory in aged rodents as a function of age. *J Neurosci* 11, 1889-1906.
- Fisher, N.D., and Hollenberg, N.K. (2006). Aging and vascular responses to flavanol-rich cocoa. *J Hypertens* 24, 1575-1580. doi: 10.1097/01.hjh.0000239293.40507.2a.
- Fisher, N.D., Sorond, F.A., and Hollenberg, N.K. (2006). Cocoa flavanols and brain perfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 47 Suppl 2, S210-214.
- Floreani, M., Napoli, E., Quintieri, L., and Palatini, P. (2003). Oral administration of trans-resveratrol to guinea pigs increases cardiac DT-diaphorase and catalase activities, and protects isolated atria from menadione toxicity. *Life Sci* 72, 2741-2750.
- Foster, T.C., and Norris, C.M. (1997). Age-associated changes in Ca(2+)-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* 7, 602-612. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:6<602::AID-HIPO3>3.0.CO;2-G.
- Francis, S.T., Head, K., Morris, P.G., and Macdonald, I.A. (2006). The effect of flavanol-rich cocoa on the fMRI response to a cognitive task in healthy young people. *J Cardiovasc Pharmacol* 47 Suppl 2, S215-220.

Frojdo, S., Cozzone, D., Vidal, H., and Pirola, L. (2007). Resveratrol is a class IA phosphoinositide 3-kinase inhibitor. *Biochem J* 406, 511-518. doi: 10.1042/BJ20070236.

## G

Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.

Gallagher, M., and Rapp, P.R. (1997). The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annu Rev Psychol* 48, 339-370. doi: 10.1146/annurev.psych.48.1.339.

Garthe, A., Behr, J., and Kempermann, G. (2009). Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One* 4, e5464. doi: 10.1371/journal.pone.0005464.

Gazova, I., Laczo, J., Rubinova, E., Mokrisova, I., Hyncicova, E., Andel, R., Vyhnalek, M., Sheardova, K., Coulson, E.J., and Hort, J. (2013). Spatial navigation in young versus older adults. *Front Aging Neurosci* 5, 94. doi: 10.3389/fnagi.2013.00094.

Geinisman, Y., Bondareff, W., and Dodge, J.T. (1977). Partial deafferentation of neurons in the dentate gyrus of the senescent rat. *Brain Res* 134, 541-545.

Geinisman, Y., De Toledo-Morrell, L., and Morrell, F. (1986). Loss of perforated synapses in the dentate gyrus: morphological substrate of memory deficit in aged rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3027-3031.

Geinisman, Y., Detoledo-Morrell, L., Morrell, F., and Heller, R.E. (1995). Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Prog Neurobiol* 45, 223-252.

Geinisman, Y., Detoledo-Morrell, L., Morrell, F., Persina, I.S., and Rossi, M. (1992). Age-related loss of axospinous synapses formed by two afferent systems in the rat dentate gyrus as revealed by the unbiased stereological dissector technique. *Hippocampus* 2, 437-444. doi: 10.1002/hipo.450020411.

Gomez-Pinilla, F. (2008). Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nat Rev Neurosci* 9, 568-578. doi: 10.1038/nrn2421.

Goodman, T., Trouche, S., Massou, I., Verret, L., Zerwas, M., Rouillet, P., and Rampon, C. (2010). Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience* 171, 769-778. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.09.047.

Gould, E., and Tanapat, P. (1999). Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 46, 1472-1479.

Goyarzu, P., Malin, D.H., Lau, F.C., Taglialatela, G., Moon, W.D., Jennings, R., Moy, E., Moy, D., Lippold, S., Shukitt-Hale, B., and Joseph, J.A. (2004). Blueberry supplemented diet: effects on object recognition memory and nuclear factor-kappa B levels in aged rats. *Nutr Neurosci* 7, 75-83. doi: 10.1080/10284150410001710410.

Gracia-Sancho, J., Villarreal, G., Jr., Zhang, Y., and Garcia-Cardena, G. (2010). Activation of SIRT1 by resveratrol induces KLF2 expression conferring an endothelial vasoprotective phenotype. *Cardiovasc Res* 85, 514-519. doi: 10.1093/cvr/cvp337.

Graziano, A., Petrosini, L., and Bartoletti, A. (2003). Automatic recognition of explorative strategies in the Morris water maze. *Journal of Neuroscience Methods* 130, 33-44. doi: 10.1016/s0165-0270(03)00187-0.



- Grootendorst, J., De Kloet, E.R., Dalm, S., and Oitzl, M.S. (2001). Reversal of cognitive deficit of apolipoprotein E knockout mice after repeated exposure to a common environmental experience. *Neuroscience* 108, 237-247.
- Guzowski, J.F., Lyford, G.L., Stevenson, G.D., Houston, F.P., Mcgaugh, J.L., Worley, P.F., and Barnes, C.A. (2000). Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20, 3993-4001.
- Guzowski, J.F., Setlow, B., Wagner, E.K., and Mcgaugh, J.L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci* 21, 5089-5098.

## *H*

- Haider, U.G., Sorescu, D., Griendling, K.K., Vollmar, A.M., and Dirsch, V.M. (2002). Resveratrol suppresses angiotensin II-induced Akt/protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation and subsequent hypertrophy in rat aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 62, 772-777.
- Hammond, R.S., Tull, L.E., and Stackman, R.W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 82, 26-34. doi: 10.1016/j.nlm.2004.03.005.
- Han, Y.S., Bastianetto, S., Dumont, Y., and Quirion, R. (2006). Specific plasma membrane binding sites for polyphenols, including resveratrol, in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 238-245. doi: 10.1124/jpet.106.102319.
- Haque, A.M., Hashimoto, M., Katakura, M., Tanabe, Y., Hara, Y., and Shido, O. (2006). Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *J Nutr* 136, 1043-1047.
- Harada, N., Zhao, J., Kurihara, H., Nakagata, N., and Okajima, K. (2011). Resveratrol improves cognitive function in mice by increasing production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. *J Nutr Biochem* 22, 1150-1159. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.09.016.
- Harris, K.M., and Kater, S.B. (1994). Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17, 341-371. doi: 10.1146/annurev.ne.17.030194.002013.
- Hartmann, M., Heumann, R., and Lessmann, V. (2001). Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J* 20, 5887-5897. doi: 10.1093/emboj/20.21.5887.
- Henke, K. (2010). A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. *Nat Rev Neurosci* 11, 523-532. doi: 10.1038/nrn2850.
- Hennigan, A., Callaghan, C.K., Kealy, J., Rouine, J., and Kelly, A.M. (2009). Deficits in LTP and recognition memory in the genetically hypertensive rat are associated with decreased expression of neurotrophic factors and their receptors in the dentate gyrus. *Behav Brain Res* 197, 371-377. doi: 10.1016/j.bbr.2008.09.037.
- Hertog, M.G., Hollman, P.C., Katan, M.B., and Kromhout, D. (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 20, 21-29. doi: 10.1080/01635589309514267.

- Holmes-Mcnary, M., and Baldwin, A.S., Jr. (2000). Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I $\kappa$ B kinase. *Cancer Res* 60, 3477-3483.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., Scherer, B., and Sinclair, D.A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191-196. doi: 10.1038/nature01960.
- Huang, Q., Wu, L.J., Tashiro, S., Gao, H.Y., Onodera, S., and Ikejima, T. (2005). (+)-Catechin, an ingredient of green tea, protects murine microglia from oxidative stress-induced DNA damage and cell cycle arrest. *J Pharmacol Sci* 98, 16-24.

## I

- Impey, S., Mark, M., Villacres, E.C., Poser, S., Chavkin, C., and Storm, D.R. (1996). Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 16, 973-982.
- Impey, S., Mccorkle, S.R., Cha-Molstad, H., Dwyer, J.M., Yochum, G.S., Boss, J.M., Mcweeney, S., Dunn, J.J., Mandel, G., and Goodman, R.H. (2004). Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell* 119, 1041-1054. doi: 10.1016/j.cell.2004.10.032.
- Impey, S., Smith, D.M., Obrietan, K., Donahue, R., Wade, C., and Storm, D.R. (1998). Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nat Neurosci* 1, 595-601. doi: 10.1038/2830.
- Izquierdo, I., Bevilacqua, L.R., Rossato, J.I., Da Silva, W.C., Bonini, J., Medina, J.H., and Cammarota, M. (2008). The molecular cascades of long-term potentiation underlie memory consolidation of one-trial avoidance in the CA1 region of the dorsal hippocampus, but not in the basolateral amygdala or the neocortex. *Neurotox Res* 14, 273-294.

## J

- Jaffard, R., and Jeantet, Y. (1981). Posttraining changes in excitability of the commissural path-CA1 pyramidal cell synapse in the hippocampus of mice. *Brain Res* 220, 167-172.
- Jaffard, R., Vouimba, R.M., Marighetto, A., and Garcia, R. (1996). Long-term potentiation and long-term depression in the lateral septum in spatial working and reference memory. *J Physiol Paris* 90, 339-341.
- Jang, D.S., Kang, B.S., Ryu, S.Y., Chang, I.M., Min, K.R., and Kim, Y. (1999). Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. *Biochem Pharmacol* 57, 705-712.
- Janus, C. (2004). Search strategies used by APP transgenic mice during navigation in the Morris water maze. *Learn Mem* 11, 337-346. doi: 10.1101/lm.70104.
- Jarrard, L.E. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* 60, 9-26.
- Jodar, L., and Kaneto, H. (1995). Synaptic plasticity: stairway to memory. *Jpn J Pharmacol* 68, 359-387.

- Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., and Casadesus, G. (2005). Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am J Clin Nutr* 81, 313S-316S.
- Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N.A., Bielinski, D., Martin, A., Mcewen, J.J., and Bickford, P.C. (1999). Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci* 19, 8114-8121.
- Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N.A., Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Tagliabue, G., and Bickford, P.C. (1998). Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *J Neurosci* 18, 8047-8055.
- Juan, M.E., Maijo, M., and Planas, J.M. (2010). Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 51, 391-398. doi: 10.1016/j.jpba.2009.03.026.
- Justesen, U., Knuthsen, P., and Leth, T. (1997). Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection. *Cancer Lett* 114, 165-167.

## K

- Kalt, W., Blumberg, J.B., McDonald, J.E., Vinqvist-Tymchuk, M.R., Fillmore, S.A., Graf, B.A., O'leary, J.M., and Milbury, P.E. (2008). Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *J Agric Food Chem* 56, 705-712. doi: 10.1021/jf071998l.
- Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038. doi: 10.1126/science.1067020.
- Kang, H., and Schuman, E.M. (1995). Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267, 1658-1662.
- Kaur, T., Pathak, C.M., Pandhi, P., and Khanduja, K.L. (2008). Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. *Brain Cogn* 67, 25-30. doi: 10.1016/j.bandc.2007.10.003.
- Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R., and Wojtowicz, J.M. (2002). The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 115, 97-105.
- Kelleher, R.J., 3rd, Govindarajan, A., and Tonegawa, S. (2004). Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 44, 59-73. doi: 10.1016/j.neuron.2004.09.013.
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., and Gage, F.H. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130, 391-399.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., and Gage, F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-495. doi: 10.1038/386493a0.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., and Gage, F.H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18, 3206-3212.
- Kesse-Guyot, E., Fezeu, L., Andreeva, V.A., Touvier, M., Scalbert, A., Hercberg, S., and Galan, P. (2012). Total and specific polyphenol intakes in midlife are associated with

- cognitive function measured 13 years later. *J Nutr* 142, 76-83. doi: 10.3945/jn.111.144428.
- Khanduja, K.L., Bhardwaj, A., and Kaushik, G. (2004). Resveratrol inhibits N-nitrosodiethylamine-induced ornithine decarboxylase and cyclooxygenase in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 50, 61-65.
- Kimira, M., Arai, Y., Shimoi, K., and Watanabe, S. (1998). Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *J Epidemiol* 8, 168-175.
- King, R.E., Kent, K.D., and Bomser, J.A. (2005). Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. *Chem Biol Interact* 151, 143-149. doi: 10.1016/j.cbi.2004.11.003.
- Kitabatake, Y., Sailor, K.A., Ming, G.L., and Song, H. (2007). Adult neurogenesis and hippocampal memory function: new cells, more plasticity, new memories? *Neurosurg Clin N Am* 18, 105-113, x. doi: 10.1016/j.nec.2006.10.008.
- Klempin, F., and Kempermann, G. (2007). Adult hippocampal neurogenesis and aging. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257, 271-280. doi: 10.1007/s00406-007-0731-5.
- Kohara, K., Kitamura, A., Morishima, M., and Tsumoto, T. (2001). Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science* 291, 2419-2423. doi: 10.1126/science.1057415.
- Kojima, M., Takei, N., Numakawa, T., Ishikawa, Y., Suzuki, S., Matsumoto, T., Katoh-Semba, R., Nawa, H., and Hatanaka, H. (2001). Biological characterization and optical imaging of brain-derived neurotrophic factor-green fluorescent protein suggest an activity-dependent local release of brain-derived neurotrophic factor in neurites of cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 64, 1-10.
- Krikorian, R., Boespflug, E.L., Fleck, D.E., Stein, A.L., Wightman, J.D., Shidler, M.D., and Sadat-Hossieny, S. (2012). Concord grape juice supplementation and neurocognitive function in human aging. *J Agric Food Chem* 60, 5736-5742. doi: 10.1021/jf300277g.
- Krikorian, R., Nash, T.A., Shidler, M.D., Shukitt-Hale, B., and Joseph, J.A. (2010a). Concord grape juice supplementation improves memory function in older adults with mild cognitive impairment. *Br J Nutr* 103, 730-734. doi: 10.1017/S0007114509992364.
- Krikorian, R., Shidler, M.D., Nash, T.A., Kalt, W., Vinqvist-Tymchuk, M.R., Shukitt-Hale, B., and Joseph, J.A. (2010b). Blueberry supplementation improves memory in older adults. *J Agric Food Chem* 58, 3996-4000. doi: 10.1021/jf9029332.
- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., and Etherton, T.D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 113 Suppl 9B, 71S-88S.
- Kuhnau, J. (1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24, 117-191.

## *L*

- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against

- metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127, 1109-1122. doi: 10.1016/j.cell.2006.11.013.
- Lai, Z.C., Moss, M.B., Killiany, R.J., Rosene, D.L., and Herndon, J.G. (1995). Executive system dysfunction in the aged monkey: spatial and object reversal learning. *Neurobiol Aging* 16, 947-954.
- Landfield, P.W. (1988). Hippocampal neurobiological mechanisms of age-related memory dysfunction. *Neurobiol Aging* 9, 571-579.
- Landsberg, G., Hunthausen, W., and Ackerman, L. (2003). "Canine aggression behavior problems of the dog and cat." (Saunders, Edinburgh), 385 – 426.
- Lang, U.E., Lang, F., Richter, K., Vallon, V., Lipp, H.-P., Schnermann, J., and Wolfer, D.P. (2003). Emotional instability but intact spatial cognition in adenosine receptor 1 knock out mice. *Behavioural Brain Research* 145, 179-188. doi: 10.1016/s0166-4328(03)00108-6.
- Lau, F.C., Bielinski, D.F., and Joseph, J.A. (2007). Inhibitory effects of blueberry extract on the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-activated BV2 microglia. *J Neurosci Res* 85, 1010-1017. doi: 10.1002/jnr.21205.
- Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M., and Abrous, D.N. (2000). Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11032-11037.
- Letenneur, L. (2004). Risk of dementia and alcohol and wine consumption: a review of recent results. *Biol Res* 37, 189-193.
- Letenneur, L., Proust-Lima, C., Le Gouge, A., Dartigues, J.F., and Barberger-Gateau, P. (2007). Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am J Epidemiol* 165, 1364-1371. doi: 10.1093/aje/kwm036.
- Leuner, B., Gould, E., and Shors, T.J. (2006). Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus* 16, 216-224. doi: 10.1002/hipo.20153.
- Leuner, B., Mendolia-Loffredo, S., Kozorovitskiy, Y., Samburg, D., Gould, E., and Shors, T.J. (2004). Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *J Neurosci* 24, 7477-7481. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0204-04.2004.
- Li, Q., Zhao, H.F., Zhang, Z.F., Liu, Z.G., Pei, X.R., Wang, J.B., Cai, M.Y., and Li, Y. (2009a). Long-term administration of green tea catechins prevents age-related spatial learning and memory decline in C57BL/6 J mice by regulating hippocampal cyclic amp-response element binding protein signaling cascade. *Neuroscience* 159, 1208-1215. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.02.008.
- Li, Q., Zhao, H.F., Zhang, Z.F., Liu, Z.G., Pei, X.R., Wang, J.B., and Li, Y. (2009b). Long-term green tea catechin administration prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing Abeta1-42 oligomers and upregulating synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus. *Neuroscience* 163, 741-749. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.07.014.
- Li, S.C., and Rieckmann, A. (2014). Neuromodulation and aging: implications of aging neuronal gain control on cognition. *Curr Opin Neurobiol* 29C, 148-158. doi: 10.1016/j.conb.2014.07.009.

Lindner, M.D. (1997). Reliability, distribution, and validity of age-related cognitive deficits in the Morris water maze. *Neurobiol Learn Mem* 68, 203-220. doi: 10.1006/nlme.1997.3782.

Liu, S., Wang, J., Zhu, D., Fu, Y., Lukowiak, K., and Lu, Y.M. (2003). Generation of functional inhibitory neurons in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 23, 732-736.

## M

Magnusson, K.R., Scruggs, B., Aniya, J., Wright, K.C., Ontl, T., Xing, Y., and Bai, L. (2003). Age-related deficits in mice performing working memory tasks in a water maze. *Behav Neurosci* 117, 485-495.

Magnusson, K.R., Scruggs, B., Zhao, X., and Hammersmark, R. (2007). Age-related declines in a two-day reference memory task are associated with changes in NMDA receptor subunits in mice. *BMC Neurosci* 8, 43. doi: 10.1186/1471-2202-8-43.

Maguire, C., Casey, M., Kelly, A., Mullany, P.M., and Lynch, M.A. (1999). Activation of tyrosine receptor kinase plays a role in expression of long-term potentiation in the rat dentate gyrus. *Hippocampus* 9, 519-526. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:5<519::AID-HIPO5>3.0.CO;2-Y.

Maguire, E.A., Burgess, N., Donnett, J.G., Frackowiak, R.S., Frith, C.D., and O'keefe, J. (1998). Knowing where and getting there: a human navigation network. *Science* 280, 921-924.

Maguire, E.A., Burke, T., Phillips, J., and Staunton, H. (1996a). Topographical disorientation following unilateral temporal lobe lesions in humans. *Neuropsychologia* 34, 993-1001.

Maguire, E.A., Frackowiak, R.S., and Frith, C.D. (1996b). Learning to find your way: a role for the human hippocampal formation. *Proc Biol Sci* 263, 1745-1750. doi: 10.1098/rspb.1996.0255.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727-747.

Mandel, S., and Youdim, M.B. (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med* 37, 304-317. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.012.

Manna, S.K., Mukhopadhyay, A., and Aggarwal, B.B. (2000). Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 164, 6509-6519.

Manns, M., Leske, O., Gottfried, S., Bichler, Z., Lafenetre, P., Wahle, P., and Heumann, R. (2011). Role of neuronal ras activity in adult hippocampal neurogenesis and cognition. *Front Neurosci* 5, 18. doi: 10.3389/fnins.2011.00018.

Marighetto, A., Etchamendy, N., Touzani, K., Torrea, C.C., Yee, B.K., Rawlins, J.N., and 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.

Markowska, A.L., Stone, W.S., Ingram, D.K., Reynolds, J., Gold, P.E., Conti, L.H., Pontecorvo, M.J., Wenk, G.L., and Olton, D.S. (1989). Individual differences in aging: behavioral and neurobiological correlates. *Neurobiol Aging* 10, 31-43.

- Martin, K.C., Barad, M., and Kandel, E.R. (2000). Local protein synthesis and its role in synapse-specific plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 10, 587-592.
- Martinez-Florez, S., Gutierrez-Fernandez, B., Sanchez-Campos, S., Gonzalez-Gallego, J., and Tunon, M.J. (2005). Quercetin attenuates nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide production in interleukin-1beta-activated rat hepatocytes. *J Nutr* 135, 1359-1365.
- Martinez, J., and Moreno, J.J. (2000). Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol* 59, 865-870.
- Mccaffery, P., Zhang, J., and Crandall, J.E. (2006). Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus. *J Neurobiol* 66, 780-791. doi: 10.1002/neu.20237.
- Mcdonald, H.Y., and Wojtowicz, J.M. (2005). Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci Lett* 385, 70-75. doi: 10.1016/j.neulet.2005.05.022.
- Mcdonald, R.J., Devan, B.D., and Hong, N.S. (2004). Multiple memory systems: the power of interactions. *Neurobiol Learn Mem* 82, 333-346. doi: 10.1016/j.nlm.2004.05.009.
- Medvedik, O., Lamming, D.W., Kim, K.D., and Sinclair, D.A. (2007). MSN2 and MSN4 link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol* 5, e261. doi: 10.1371/journal.pbio.0050261.
- Merrill, D.A., Karim, R., Darraq, M., Chiba, A.A., and Tuszynski, M.H. (2003). Hippocampal cell genesis does not correlate with spatial learning ability in aged rats. *J Comp Neurol* 459, 201-207. doi: 10.1002/cne.10616.
- Messier, C. (1997). Object recognition in mice: improvement of memory by glucose. *Neurobiol Learn Mem* 67, 172-175. doi: 10.1006/nlme.1996.3755.
- Michalski, B., and Fahnstock, M. (2003). Pro-brain-derived neurotrophic factor is decreased in parietal cortex in Alzheimer's disease. *Molecular Brain Research* 111, 148-154. doi: 10.1016/s0169-328x(03)00003-2.
- Micheau, J., Riedel, G., Roloff, E., Inglis, J., and Morris, R.G. (2004). Reversible hippocampal inactivation partially dissociates how and where to search in the water maze. *Behav Neurosci* 118, 1022-1032. doi: 10.1037/0735-7044.118.5.1022.
- Milbury, P.E., and Kalt, W. (2010). Xenobiotic metabolism and berry flavonoid transport across the blood-brain barrier. *J Agric Food Chem* 58, 3950-3956. doi: 10.1021/jf903529m.
- Milgram, N.W. (2003). Cognitive experience and its effect on age-dependent cognitive decline in beagle dogs. *Neurochem Res* 28, 1677-1682.
- Milgram, N.W., Head, E., Muggenburg, B., Holowachuk, D., Murphey, H., Estrada, J., Ikeda-Douglas, C.J., Zicker, S.C., and Cotman, C.W. (2002). Landmark discrimination learning in the dog: effects of age, an antioxidant fortified food, and cognitive strategy. *Neurosci Biobehav Rev* 26, 679-695.
- Milgram, N.W., Head, E., Zicker, S.C., Ikeda-Douglas, C., Murphey, H., Muggenberg, B.A., Siwak, C.T., Tapp, P.D., Lowry, S.R., and Cotman, C.W. (2004). Long-term treatment with antioxidants and a program of behavioral enrichment reduces age-dependent impairment in discrimination and reversal learning in beagle dogs. *Exp Gerontol* 39, 753-765. doi: 10.1016/j.exger.2004.01.007.

- Milgram, N.W., Head, E., Zicker, S.C., Ikeda-Douglas, C.J., Murphey, H., Muggenburg, B., Siwak, C., Tapp, D., and Cotman, C.W. (2005). Learning ability in aged beagle dogs is preserved by behavioral enrichment and dietary fortification: a two-year longitudinal study. *Neurobiol Aging* 26, 77-90. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.02.014.
- Mingaud, F., Mormede, C., Etchamendy, N., Mons, N., Niedergang, B., Wietrych, M., Pallet, V., Jaffard, R., Krezel, W., Higuieret, P., and Marighetto, A. (2008). Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J Neurosci* 28, 279-291. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4065-07.2008.
- Mizutani, K., Ikeda, K., Kawai, Y., and Yamori, Y. (2001). Protective effect of resveratrol on oxidative damage in male and female stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28, 55-59.
- Mohapel, P., Mundt-Petersen, K., Brundin, P., and Frielingsdorf, H. (2006). Working memory training decreases hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 142, 609-613. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.07.033.
- Moore, C.I., Browning, M.D., and Rose, G.M. (1993). Hippocampal plasticity induced by primed burst, but not long-term potentiation, stimulation is impaired in area CA1 of aged Fischer 344 rats. *Hippocampus* 3, 57-66. doi: 10.1002/hipo.450030106.
- Moreno, J.J. (2000). Resveratrol modulates arachidonic acid release, prostaglandin synthesis, and 3T6 fibroblast growth. *J Pharmacol Exp Ther* 294, 333-338.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11, 47-60.
- Morris, R.G. (2006). Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci* 23, 2829-2846. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04888.x.
- Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., and Baudry, M. (1986a). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774-776. doi: 10.1038/319774a0.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., and O'keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681-683.
- Morris, R.G., Hagan, J.J., and Rawlins, J.N. (1986b). Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the "spatial mapping" and "working memory" theories of hippocampal function. *Q J Exp Psychol B* 38, 365-395.
- Moser, E., Moser, M.B., and Andersen, P. (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 13, 3916-3925.
- Moser, E.I., Krobot, K.A., Moser, M.B., and Morris, R.G. (1998). Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. *Science* 281, 2038-2042.
- Moser, M.B., Moser, E.I., Forrest, E., Andersen, P., and Morris, R.G. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9697-9701.
- Mumby, D.G. (2001). Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behav Brain Res* 127, 159-181.



- Murphy, T., Dias, G.P., and Thuret, S. (2014). Effects of diet on brain plasticity in animal and human studies: mind the gap. *Neural Plast* 2014, 563160. doi: 10.1155/2014/563160.
- Murray, E.A., Baxter, M.G., and Gaffan, D. (1998). Monkeys with rhinal cortex damage or neurotoxic hippocampal lesions are impaired on spatial scene learning and object reversals. *Behav Neurosci* 112, 1291-1303.

## N

- Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., Mchugh, T.J., Rodriguez Barrera, V., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., Mcbain, C.J., Fanselow, M.S., and Tonegawa, S. (2012). Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell* 149, 188-201. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.046.
- Namestkova, K., Simonova, Z., and Sykova, E. (2005). Decreased proliferation in the adult rat hippocampus after exposure to the Morris water maze and its reversal by fluoxetine. *Behav Brain Res* 163, 26-32. doi: 10.1016/j.bbr.2005.04.013.
- Neilson, J.C., Hart, B.L., Cliff, K.D., and Ruehl, W.W. (2001). Prevalence of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 218, 1787-1791.
- Nguyen, N., Lee, S.B., Lee, Y.S., Lee, K.H., and Ahn, J.Y. (2009). Neuroprotection by NGF and BDNF against neurotoxin-exerted apoptotic death in neural stem cells are mediated through Trk receptors, activating PI3-kinase and MAPK pathways. *Neurochem Res* 34, 942-951. doi: 10.1007/s11064-008-9848-9.
- Nicita-Mauro, V. (2002). Parkinson's disease, Parkinsonism and aging. *Arch Gerontol Geriatr Suppl* 8, 225-238.
- Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O., and Eriksson, P.S. (1999). Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 39, 569-578.
- Nippak, P.M., Mendelson, J., Muggenburg, B., and Milgram, N.W. (2007). Enhanced spatial ability in aged dogs following dietary and behavioural enrichment. *Neurobiol Learn Mem* 87, 610-623. doi: 10.1016/j.nlm.2007.01.001.
- Noroozi, M., Burns, J., Crozier, A., Kelly, I.E., and Lean, M.E. (2000). Prediction of dietary flavonol consumption from fasting plasma concentration or urinary excretion. *Eur J Clin Nutr*;54:143-9.
- Nyberg, L., Lovden, M., Riklund, K., Lindenberger, U., and Backman, L. (2012). Memory aging and brain maintenance. *Trends Cogn Sci* 16, 292-305. doi: 10.1016/j.tics.2012.04.005.

## O

- O'keefe, J., and Conway, D.H. (1978). Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Exp Brain Res* 31, 573-590.
- O'keefe, J., and Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34, 171-175.

- O'keefe, J., Nadel, L., Keightley, S., and Kill, D. (1975). Fornix lesions selectively abolish place learning in the rat. *Exp Neurol* 48, 152-166.
- Overstreet-Wadiche, L.S., and Westbrook, G.L. (2006). Functional maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus* 16, 208-215. doi: 10.1002/hipo.20152.

**P**

- Pacholec, M., Bleasdale, J.E., Chrnyk, B., Cunningham, D., Flynn, D., Garofalo, R.S., Griffith, D., Griffor, M., Loulakis, P., Pabst, B., Qiu, X., Stockman, B., Thanabal, V., Varghese, A., Ward, J., Withka, J., and Ahn, K. (2010). SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem* 285, 8340-8351. doi: 10.1074/jbc.M109.088682.
- Palmer, T.D., Willhoite, A.R., and Gage, F.H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425, 479-494.
- Papandreou, M.A., Dimakopoulou, A., Linardaki, Z.I., Cordopatis, P., Klimis-Zacas, D., Margaritis, M., and Lamari, F.N. (2009). Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. *Behav Brain Res* 198, 352-358. doi: 10.1016/j.bbr.2008.11.013.
- Park, D.C., and Reuter-Lorenz, P. (2009). The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annu Rev Psychol* 60, 173-196. doi: 10.1146/annurev.psych.59.103006.093656.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., and Mattivi, F. (2005). Fast access of some grape pigments to the brain. *J Agric Food Chem* 53, 7029-7034. doi: 10.1021/jf050565k.
- Patterson, S.L., Abel, T., Deuel, T.A., Martin, K.C., Rose, J.C., and Kandel, E.R. (1996). Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16, 1137-1145.
- Pearson, K.J., Baur, J.A., Lewis, K.N., Peshkin, L., Price, N.L., Labinskyy, N., Swindell, W.R., Kamara, D., Minor, R.K., Perez, E., Jamieson, H.A., Zhang, Y., Dunn, S.R., Sharma, K., Pleshko, N., Woollett, L.A., Csiszar, A., Ikeno, Y., Le Couteur, D., Elliott, P.J., Becker, K.G., Navas, P., Ingram, D.K., Wolf, N.S., Ungvari, Z., Sinclair, D.A., and De Cabo, R. (2008). Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab* 8, 157-168. doi: 10.1016/j.cmet.2008.06.011.
- Peng, C., Wang, X., Chen, J., Jiao, R., Wang, L., Li, Y.M., Zuo, Y., Liu, Y., Lei, L., Ma, K.Y., Huang, Y., and Chen, Z.Y. (2014). Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *Biomed Res Int* 2014, 831841. doi: 10.1155/2014/831841.
- Peng, S., Wu, J., Mufson, E.J., and Fahnstock, M. (2005). Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 93, 1412-1421. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03135.x.
- Pfluger, P.T., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., Serrano, M., and Tschop, M.H. (2008). Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9793-9798. doi: 10.1073/pnas.0802917105.

- Pham, T.A., Impey, S., Storm, D.R., and Stryker, M.P. (1999). CRE-mediated gene transcription in neocortical neuronal plasticity during the developmental critical period. *Neuron* 22, 63-72.
- Pham, T.M., Winblad, B., Granholm, A.C., and Mohammed, A.H. (2002). Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73, 167-175.
- Phenol-Explorer <http://www.phenol-explorer.eu> [Online]. [Accessed].
- Phillips, H.S., Hains, J.M., Armanini, M., Laramée, G.R., Johnson, S.A., and Winslow, J.W. (1991). BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 7, 695-702.
- Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., Machado De Oliveira, R., Leid, M., Mcburney, M.W., and Guarente, L. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429, 771-776. doi: 10.1038/nature02583.
- Poo, M.M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2, 24-32. doi: 10.1038/35049004.
- Porte, Y., Buhot, M.C., and Mons, N. (2008). Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice. *Neurobiol Aging* 29, 1533-1546. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.023.
- Prasain, J.K., Peng, N., Dai, Y., Moore, R., Arabshahi, A., Wilson, L., Barnes, S., Michael Wyss, J., Kim, H., and Watts, R.L. (2009). Liquid chromatography tandem mass spectrometry identification of proanthocyanidins in rat plasma after oral administration of grape seed extract. *Phytomedicine* 16, 233-243. doi: 10.1016/j.phymed.2008.08.006.
- Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., and Mainland, C.M. (1998). Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of Vaccinium Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 2686-2693. doi: 10.1021/jf980145d.
- Pruunsild, P., Sepp, M., Orav, E., Koppel, I., and Timmusk, T. (2011). Identification of cis-elements and transcription factors regulating neuronal activity-dependent transcription of human BDNF gene. *J Neurosci* 31, 3295-3308. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4540-10.2011.

## Q

- Queen, B.L., and Tollefsbol, T.O. (2010). Polyphenols and aging. *Curr Aging Sci* 3, 34-42.
- Quick, K.L., Ali, S.S., Arch, R., Xiong, C., Wozniak, D., and Dugan, L.L. (2008). A carboxyfullerene SOD mimetic improves cognition and extends the lifespan of mice. *Neurobiol Aging* 29, 117-128. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.09.014.

## R

- Radtke, J., Linseisen, J., and Wolfram, G. (1998). [Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey]. *Z Ernährungswiss* 37, 190-197.

- Radtke, J., Linseisen, J., and Wolfram, G. (2002). Fasting plasma concentrations of selected flavonoids as markers of their ordinary dietary intake. *Eur J Nutr* 41, 203-209. doi: 10.1007/s00394-002-0377-z.
- Ramirez-Amaya, V., Marrone, D.F., Gage, F.H., Worley, P.F., and Barnes, C.A. (2006). Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci* 26, 12237-12241. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2195-06.2006.
- Ramirez, M.R., Izquierdo, I., Do Carmo Bassols Raseira, M., Zuanazzi, J.A., Barros, D., and Henriques, A.T. (2005). Effect of lyophilised Vaccinium berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. *Pharmacol Res* 52, 457-462. doi: 10.1016/j.phrs.2005.07.003.
- Rao, M.S., and Shetty, A.K. (2004). Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 19, 234-246.
- Rapp, P.R., Kansky, M.T., and Roberts, J.A. (1997). Impaired spatial information processing in aged monkeys with preserved recognition memory. *Neuroreport* 8, 1923-1928.
- Rendeiro, C., Foley, A., Lau, V.C., Ring, R., Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Williams, C.M., Regan, C., and Spencer, J.P. (2013a). A role for hippocampal PSA-NCAM and NMDA-NR2B receptor function in flavonoid-induced spatial memory improvements in young rats. *Neuropharmacology* 79C, 335-344. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.003.
- Rendeiro, C., Spencer, J.P., Vauzour, D., Butler, L.T., Ellis, J.A., and Williams, C.M. (2009). The impact of flavonoids on spatial memory in rodents: from behaviour to underlying hippocampal mechanisms. *Genes Nutr* 4, 251-270. doi: 10.1007/s12263-009-0137-2.
- Rendeiro, C., Vauzour, D., Kean, R.J., Butler, L.T., Rattray, M., Spencer, J.P., and Williams, C.M. (2012). Blueberry supplementation induces spatial memory improvements and region-specific regulation of hippocampal BDNF mRNA expression in young rats. *Psychopharmacology (Berl)* 223, 319-330. doi: 10.1007/s00213-012-2719-8.
- Rendeiro, C., Vauzour, D., Rattray, M., Waffo-Teguo, P., Merillon, J.M., Butler, L.T., Williams, C.M., and Spencer, J.P. (2013b). Dietary levels of pure flavonoids improve spatial memory performance and increase hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *PLoS One* 8, e63535. doi: 10.1371/journal.pone.0063535.
- Riedel, G., Micheau, J., Lam, A.G., Roloff, E.L., Martin, S.J., Bridge, H., De Hoz, L., Poeschel, B., McCulloch, J., and Morris, R.G. (1999). Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci* 2, 898-905. doi: 10.1038/13202.
- Robb, E.L., Winkelmoen, L., Visanji, N., Brotchie, J., and Stuart, J.A. (2008). Dietary resveratrol administration increases MnSOD expression and activity in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 372, 254-259. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.05.028.
- Rosenzweig, E.S., and Barnes, C.A. (2003). Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in Neurobiology* 69, 143-179. doi: 10.1016/s0301-0082(02)00126-0.
- Rosenzweig, E.S., Rao, G., Mcnaughton, B.L., and Barnes, C.A. (1997). Role of temporal summation in age-related long-term potentiation-induction deficits. *Hippocampus* 7, 549-558. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:5<549::AID-HIPO10>3.0.CO;2-0.

- Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R., Myskiw, J.C., Medina, J.H., Izquierdo, I., and Cammarota, M. (2007). On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 14, 36-46. doi: 10.1101/lm.422607.
- Rotondo, S., Rajtar, G., Manarini, S., Celardo, A., Rotillo, D., De Gaetano, G., Evangelista, V., and Cerletti, C. (1998). Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br J Pharmacol* 123, 1691-1699. doi: 10.1038/sj.bjp.0701784.
- Ruediger, S., Spirig, D., Donato, F., and Caroni, P. (2012). Goal-oriented searching mediated by ventral hippocampus early in trial-and-error learning. *Nat Neurosci* 15, 1563-1571. doi: 10.1038/nn.3224.

## S

- Sakata, Y., Zhuang, H., Kwansa, H., Koehler, R.C., and Dore, S. (2010). Resveratrol protects against experimental stroke: putative neuroprotective role of heme oxygenase 1. *Exp Neurol* 224, 325-329. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.03.032.
- Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E., Yagi, T., Aizawa, S., Inoue, Y., Sugiyama, H., and Et Al. (1995). Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* 373, 151-155. doi: 10.1038/373151a0.
- Salehi, A., Delcroix, J.D., and Mobley, W.C. (2003). Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. *Trends Neurosci* 26, 73-80. doi: 10.1016/S0166-2236(02)00038-3.
- Sampson, L., Rimm, E., Hollman, P.C., De Vries, J.H., and Katan, M.B. (2002). Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc* 102, 1414-1420.
- Santos-Buelga, C., and Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric*; 80:1094–117.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., and Remesy, C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* 56, 276-282.
- Scalbert, A., and Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 2073S-2085S.
- Schaaf, M.J., Workel, J.O., Lesscher, H.M., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., and De Kloet, E.R. (2001). Correlation between hippocampal BDNF mRNA expression and memory performance in senescent rats. *Brain Res* 915, 227-233.
- Scharfman, H., Goodman, J., Macleod, A., Phani, S., Antonelli, C., and Croll, S. (2005). Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol* 192, 348-356. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.11.016.
- Schinder, A.F., and Gage, F.H. (2004). A hypothesis about the role of adult neurogenesis in hippocampal function. *Physiology (Bethesda)* 19, 253-261. doi: 10.1152/physiol.00012.2004.
- Schinder, A.F., and Poo, M. (2000). The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 23, 639-645.

- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., and Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429, 184-187. doi: 10.1038/nature02553.
- Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182, 311-322. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
- Schroeter, H., Bahia, P., Spencer, J.P., Sheppard, O., Rattray, M., Cadenas, E., Rice-Evans, C., and Williams, R.J. (2007). (-)Epicatechin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and up-regulates GluR2 in cortical neurons. *J Neurochem* 101, 1596-1606. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04434.x.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C.L., Hollenberg, N.K., Sies, H., Kwik-Urbe, C., Schmitz, H.H., and Kelm, M. (2006). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1024-1029. doi: 10.1073/pnas.0510168103.
- Selkoe, D.J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298, 789-791. doi: 10.1126/science.1074069.
- Seow, A., Shi, C.Y., Franke, A.A., Hankin, J.H., Lee, H.P., and Yu, M.C. (1998). Isoflavonoid levels in spot urine are associated with frequency of dietary soy intake in a population-based sample of middle-aged and older Chinese in Singapore. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7, 135-140.
- Shan, Q., Lu, J., Zheng, Y., Li, J., Zhou, Z., Hu, B., Zhang, Z., Fan, S., Mao, Z., Wang, Y.J., and Ma, D. (2009). Purple sweet potato color ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage and inflammation in aging mouse brain induced by D-galactose. *J Biomed Biotechnol* 2009, 564737. doi: 10.1155/2009/564737.
- Shankar, S., Singh, G., and Srivastava, R.K. (2007). Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Front Biosci* 12, 4839-4854.
- Sharma, S., Rakoczy, S., and Brown-Borg, H. (2010). Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci* 87, 521-536. doi: 10.1016/j.lfs.2010.09.004.
- Shigematsu, S., Ishida, S., Hara, M., Takahashi, N., Yoshimatsu, H., Sakata, T., and Korthuis, R.J. (2003). Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia/reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants. *Free Radic Biol Med* 34, 810-817.
- Shih, P.H., Chan, Y.C., Liao, J.W., Wang, M.F., and Yen, G.C. (2010). Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 21, 598-605. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.03.008.
- Shukitt-Hale, B., Carey, A., Simon, L., Mark, D.A., and Joseph, J.A. (2006). Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. *Nutrition* 22, 295-302. doi: 10.1016/j.nut.2005.07.016.
- Shukitt-Hale, B., Carey, A.N., Jenkins, D., Rabin, B.M., and Joseph, J.A. (2007). Beneficial effects of fruit extracts on neuronal function and behavior in a rodent model of accelerated aging. *Neurobiol Aging* 28, 1187-1194. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.031.

- Shukitt-Hale, B., Cheng, V., and Joseph, J.A. (2009). Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats. *Nutr Neurosci* 12, 135-140. doi: 10.1179/147683009X423292.
- Shukitt-Hale, B., Lau, F.C., and Joseph, J.A. (2008). Berry fruit supplementation and the aging brain. *J Agric Food Chem* 56, 636-641. doi: 10.1021/jf072505f.
- Silhol, M., Bonnichon, V., Rage, F., and Tapia-Arancibia, L. (2005). Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience* 132, 613-624. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.01.008.
- Simmons, D.L., Botting, R.M., and Hla, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 56, 387-437. doi: 10.1124/pr.56.3.3.
- Simonyi, A., Murch, K., and Sun, G.Y. (2003). Extracellular signal-regulated kinase 2 mRNA expression in the rat brain during aging. *Neurochem Res* 28, 1375-1378.
- Siwak, C.T., Tapp, P.D., Head, E., Zicker, S.C., Murphey, H.L., Muggenburg, B.A., Ikeda-Douglas, C.J., Cotman, C.W., and Milgram, N.W. (2005). Chronic antioxidant and mitochondrial cofactor administration improves discrimination learning in aged but not young dogs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29, 461-469. doi: 10.1016/j.pnpbp.2004.12.011.
- Smith, T.D., Adams, M.M., Gallagher, M., Morrison, J.H., and Rapp, P.R. (2000). Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *J Neurosci* 20, 6587-6593.
- Snyder, J.S., Hong, N.S., McDonald, R.J., and Wojtowicz, J.M. (2005). A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130, 843-852. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.10.009.
- Somogyi, P., and Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562, 9-26. doi: 10.1113/jphysiol.2004.078915.
- Sossin, W.S. (2008). Defining memories by their distinct molecular traces. *Trends Neurosci* 31, 170-175. doi: 10.1016/j.tins.2008.01.001.
- Speakman, J.R., and Mitchell, S.E. (2011). Caloric restriction. *Mol Aspects Med* 32, 159-221. doi: 10.1016/j.mam.2011.07.001.
- Spencer, J.P. (2007). The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways. *Genes Nutr* 2, 257-273. doi: 10.1007/s12263-007-0056-z.
- Spencer, J.P. (2008). Flavonoids: modulators of brain function? *Br J Nutr* 99 E Suppl 1, ES60-77. doi: 10.1017/S0007114508965776.
- Spencer, J.P. (2010). Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *Proc Nutr Soc* 69, 244-260. doi: 10.1017/S0029665110000054.
- Spencer, J.P., Abd El Mohsen, M.M., Minihane, A.M., and Mathers, J.C. (2008). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br J Nutr* 99, 12-22. doi: 10.1017/S0007114507798938.
- Spencer, J.P., Schroeter, H., Kuhnle, G., Srai, S.K., Tyrrell, R.M., Hahn, U., and Rice-Evans, C. (2001). Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect

- human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *Biochem J* 354, 493-500.
- Spencer, J.P., Vauzour, D., and Rendeiro, C. (2009). Flavonoids and cognition: the molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Arch Biochem Biophys* 492, 1-9. doi: 10.1016/j.abb.2009.10.003.
- Squire, L.R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82, 171-177. doi: 10.1016/j.nlm.2004.06.005.
- Squire, L.R., Wixted, J.T., and Clark, R.E. (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci* 8, 872-883. doi: 10.1038/nrn2154.
- Stangl, D., and Thuret, S. (2009). Impact of diet on adult hippocampal neurogenesis. *Genes Nutr* 4, 271-282. doi: 10.1007/s12263-009-0134-5.
- Steckler, T., Weis, C., Sauvage, M., Mederer, A., and Holsboer, F. (1999). Disrupted allocentric but preserved egocentric spatial learning in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. *Behav Brain Res* 100, 77-89.
- Stein, J.H., Keevil, J.G., Wiebe, D.A., Aeschlimann, S., and Folts, J.D. (1999). Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation* 100, 1050-1055.
- Steiner, B., Kronenberg, G., Jessberger, S., Brandt, M.D., Reuter, K., and Kempermann, G. (2004). Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46, 41-52. doi: 10.1002/glia.10337.
- Stoelzel, C.R., Stavnezer, A.J., Denenberg, V.H., Ward, M., and Markus, E.J. (2002). The effects of aging and dorsal hippocampal lesions: performance on spatial and nonspatial comparable versions of the water maze. *Neurobiol Learn Mem* 78, 217-233.
- Sullivan, E.V., Adalsteinsson, E., Hedehus, M., Ju, C., Moseley, M., Lim, K.O., and Pfefferbaum, A. (2001). Equivalent disruption of regional white matter microstructure in ageing healthy men and women. *Neuroreport* 12, 99-104.
- Sun, A.Y., Simonyi, A., and Sun, G.Y. (2002). The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Biol Med* 32, 314-318.
- Surh, Y.J., Hurh, Y.J., Kang, J.Y., Lee, E., Kong, G., and Lee, S.J. (1999). Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett* 140, 1-10.
- Sutherland, R.J., Whishaw, I.Q., and Regehr, J.C. (1982). Cholinergic receptor blockade impairs spatial localization by use of distal cues in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 96, 563-573.
- Sweatt, J.D. (2001). The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 76, 1-10.
- Sweatt, J.D. (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14, 311-317. doi: 10.1016/j.conb.2004.04.001.

## T

- Tan, L., Yang, H.P., Pang, W., Lu, H., Hu, Y.D., Li, J., Lu, S.J., Zhang, W.Q., and Jiang, Y.G. (2014). Cyanidin-3-O-galactoside and Blueberry Extracts Supplementation Improves Spatial Memory and Regulates Hippocampal ERK Expression in



- Senescence-accelerated Mice. *Biomed Environ Sci* 27, 186-196. doi: 10.3967/bes2014.007.
- Teixeira, C.M., Pomedli, S.R., Maei, H.R., Kee, N., and Frankland, P.W. (2006). Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *J Neurosci* 26, 7555-7564. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1068-06.2006.
- Teng, E., and Squire, L.R. (1999). Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature* 400, 675-677. doi: 10.1038/23276.
- Thibault, O., and Landfield, P.W. (1996). Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. *Science* 272, 1017-1020.
- Toescu, E.C., Verkhatsky, A., and Landfield, P.W. (2004). Ca<sup>2+</sup> regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends Neurosci* 27, 614-620. doi: 10.1016/j.tins.2004.07.010.
- Topic, B., Willuhn, I., Palomero-Gallagher, N., Zilles, K., Huston, J.P., and Hasenohrl, R.U. (2007). Impaired maze performance in aged rats is accompanied by increased density of NMDA, 5-HT<sub>1A</sub>, and alpha-adrenoceptor binding in hippocampus. *Hippocampus* 17, 68-77. doi: 10.1002/hipo.20246.
- Touzani, K., Marighetto, A., and Jaffard, R. (2003). Fos imaging reveals ageing-related changes in hippocampal response to radial maze discrimination testing in mice. *Eur J Neurosci* 17, 628-640.
- Tronche, C., Lestage, P., Louis, C., Carrie, I., and Beracochea, D. (2010). Pharmacological modulation of contextual "episodic-like" memory in aged mice. *Behav Brain Res* 215, 255-260. doi: 10.1016/j.bbr.2010.04.009.
- Trouche, S., Bontempi, B., Roulet, P., and Rampon, C. (2009). Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5919-5924. doi: 10.1073/pnas.0811054106.
- Tsien, J.Z., Huerta, P.T., and Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87, 1327-1338.
- Tyler, W.J., Alonso, M., Bramham, C.R., and Pozzo-Miller, L.D. (2002). From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem* 9, 224-237. doi: 10.1101/lm.51202.

## U

- Uttl, B., and Graf, P. (1993). Episodic spatial memory in adulthood. *Psychol Aging* 8, 257-273.

## V

- Vafeiadou, K., Vauzour, D., Lee, H.Y., Rodriguez-Mateos, A., Williams, R.J., and Spencer, J.P. (2009). The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Arch Biochem Biophys* 484, 100-109. doi: 10.1016/j.abb.2009.01.016.
- Vafeiadou, K., Vauzour, D., and Spencer, J.P. (2007). Neuroinflammation and its modulation by flavonoids. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 7, 211-224.

- Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., and Cellerino, A. (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol* 16, 296-300. doi: 10.1016/j.cub.2005.12.038.
- Vallee, M., Maccari, S., Dellu, F., Simon, H., Le Moal, M., and Mayo, W. (1999). Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur J Neurosci* 11, 2906-2916.
- Van Der Borght, K., Wallinga, A.E., Luiten, P.G., Eggen, B.J., and Van Der Zee, E.A. (2005). Morris water maze learning in two rat strains increases the expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the dentate gyrus but has no effect on hippocampal neurogenesis. *Behav Neurosci* 119, 926-932. doi: 10.1037/0735-7044.119.4.926.
- Van Praag, H., Lucero, M.J., Yeo, G.W., Stecker, K., Heivand, N., Zhao, C., Yip, E., Afanador, M., Schroeter, H., Hammerstone, J., and Gage, F.H. (2007). Plant-derived flavanol (-)epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. *J Neurosci* 27, 5869-5878. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0914-07.2007.
- Van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., and Gage, F.H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25, 8680-8685. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1731-05.2005.
- Vandesquille, M., Krazem, A., Louis, C., Lestage, P., and Beracochea, D. (2011). S 18986 reverses spatial working memory impairments in aged mice: comparison with memantine. *Psychopharmacology (Berl)* 215, 709-720. doi: 10.1007/s00213-011-2168-9.
- Vargha-Khadem, F., Gadian, D.G., Watkins, K.E., Connelly, A., Van Paesschen, W., and Mishkin, M. (1997). Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Science* 277, 376-380.
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Corona, G., Pollard, S.E., Tzounis, X., and Spencer, J.P. (2007). Champagne wine polyphenols protect primary cortical neurons against peroxynitrite-induced injury. *J Agric Food Chem* 55, 2854-2860. doi: 10.1021/jf063304z.
- Vogiatzoglou, A., Mulligan, A.A., Luben, R.N., Lentjes, M.A., Heiss, C., Kelm, M., Merx, M.W., Spencer, J.P., Schroeter, H., and Kuhnle, G.G. (2013). Assessment of the dietary intake of total flavan-3-ols, monomeric flavan-3-ols, proanthocyanidins and theaflavins in the European Union. *Br J Nutr*, 1-11. doi: 10.1017/S0007114513003930.
- Von Bohlen Und Halbach, O. (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 329, 409-420. doi: 10.1007/s00441-007-0432-4.
- W**
- Wang, Q., Xu, J., Rottinghaus, G.E., Simonyi, A., Lubahn, D., Sun, G.Y., and Sun, A.Y. (2002). Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res* 958, 439-447.
- Wang, Y., Wang, L., Wu, J., and Cai, J. (2006). The in vivo synaptic plasticity mechanism of EGb 761-induced enhancement of spatial learning and memory in aged rats. *Br J Pharmacol* 148, 147-153. doi: 10.1038/sj.bjp.0706720.

- Weeber, E.J., and Sweatt, J.D. (2002). Molecular neurobiology of human cognition. *Neuron* 33, 845-848.
- Wei, F., Qiu, C.S., Liauw, J., Robinson, D.A., Ho, N., Chatila, T., and Zhuo, M. (2002). Calcium calmodulin-dependent protein kinase IV is required for fear memory. *Nat Neurosci* 5, 573-579. doi: 10.1038/nn855.
- Wilkniss, S.M., Jones, M.G., Korol, D.L., Gold, P.E., and Manning, C.A. (1997). Age-related differences in an ecologically based study of route learning. *Psychol Aging* 12, 372-375.
- Williams, B.J., Bimonte-Nelson, H.A., and Granholm-Bentley, A.C. (2006). ERK-mediated NGF signaling in the rat septo-hippocampal pathway diminishes with age. *Psychopharmacology (Berl)* 188, 605-618. doi: 10.1007/s00213-006-0477-1.
- Williams, C.A., and Grayer, R.J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep* 21, 539-573. doi: 10.1039/b311404j.
- Williams, C.M., El Mohsen, M.A., Vauzour, D., Rendeiro, C., Butler, L.T., Ellis, J.A., Whiteman, M., and Spencer, J.P. (2008). Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free Radic Biol Med* 45, 295-305. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.008.
- Winter, J.C. (1998). The effects of an extract of Ginkgo biloba, EGb 761, on cognitive behavior and longevity in the rat. *Physiol Behav* 63, 425-433.
- Witte, A.V., Kerti, L., Margulies, D.S., and Floel, A. (2014). Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. *J Neurosci* 34, 7862-7870. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0385-14.2014.
- Wolfer, D.P., and Lipp, H.P. (2000). Dissecting the behaviour of transgenic mice: is it the mutation, the genetic background, or the environment? *Exp Physiol* 85, 627-634.
- Wolff, M., Savova, M., Malleret, G., Segu, L., and Buhot, M.C. (2002). Differential learning abilities of 129T2/Sv and C57BL/6J mice as assessed in three water maze protocols. *Behav Brain Res* 136, 463-474.
- Wood, E.R., and Dudchenko, P.A. (2003). Aging, spatial behavior and the cognitive map. *Nat Neurosci* 6, 546-548. doi: 10.1038/nn0603-546.
- Woolf, N.J., Milov, A.M., Schweitzer, E.S., and Roghani, A. (2001). Elevation of nerve growth factor and antisense knockdown of TrkA receptor during contextual memory consolidation. *J Neurosci* 21, 1047-1055.
- Wu, X., Cao, G., and Prior, R.L. (2002). Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J Nutr* 132, 1865-1871.

## Y

- Yamada, K., and Nabeshima, T. (2003). Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* 91, 267-270.
- Yeung, F., Hoberg, J.E., Ramsey, C.S., Keller, M.D., Jones, D.R., Frye, R.A., and Mayo, M.W. (2004). Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 23, 2369-2380. doi: 10.1038/sj.emboj.7600244.

- Yokozawa, T. (2011). Anti-aging effects of oligomeric proanthocyanidins isolated from persimmon fruits. *Drug Discoveries & Therapeutics*. doi: 10.5582/ddt.2011.v5.3.109.
- Youdim, K.A., Qaiser, M.Z., Begley, D.J., Rice-Evans, C.A., and Abbott, N.J. (2004). Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med* 36, 592-604. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.023.
- Yu, S.Y., Zhang, M., Luo, J., Zhang, L., Shao, Y., and Li, G. (2013). Curcumin ameliorates memory deficits via neuronal nitric oxide synthase in aged mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 45, 47-53. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.05.001.

## Z

- Zamora-Ros, R., Knaze, V., Lujan-Barroso, L., Romieu, I., Scalbert, A., Slimani, N., Hjartaker, A., Engeset, D., Skeie, G., Overvad, K., Bredsdorff, L., Tjønneland, A., Halkjaer, J., Key, T.J., Khaw, K.T., Mulligan, A.A., Winkvist, A., Johansson, I., Bueno-De-Mesquita, H.B., Peeters, P.H., Wallstrom, P., Ericson, U., Pala, V., De Magistris, M.S., Polidoro, S., Tumino, R., Trichopoulou, A., Dilis, V., Katsoulis, M., Huerta, J.M., Martinez, V., Sanchez, M.J., Ardanaz, E., Amiano, P., Teucher, B., Grote, V., Bendinelli, B., Boeing, H., Forster, J., Touillaud, M., Perquier, F., Fagherazzi, G., Gallo, V., Riboli, E., and Gonzalez, C.A. (2013). Differences in dietary intakes, food sources and determinants of total flavonoids between Mediterranean and non-Mediterranean countries participating in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Br J Nutr* 109, 1498-1507. doi: 10.1017/S0007114512003273.
- Zang, M., Xu, S., Maitland-Toolan, K.A., Zuccollo, A., Hou, X., Jiang, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T.J., and Cohen, R.A. (2006). Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes* 55, 2180-2191. doi: 10.2337/db05-1188.
- Zhao, C., Deng, W., and Gage, F.H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.033.
- Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G., Jr., Ming, G.L., and Gage, F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26, 3-11. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006.
- Zhong, W.X., Dong, Z.F., Tian, M., Cao, J., Xu, L., and Luo, J.H. (2006). N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long-term potentiation in CA1 region affects synaptic expression of glutamate receptor subunits and associated proteins in the whole hippocampus. *Neuroscience* 141, 1399-1413. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.04.070.