

Université de Montréal

**Le rôle des acides gras oméga-3 sur la balance énergétique,  
la régulation de l'appétit, l'état émotionnel et l'implication  
du récepteur GPR120**

par

Stéphanie Auguste

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en nutrition

Mai, 2016

© Stéphanie Auguste, 2016

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Le rôle des acides gras oméga-3 sur la balance énergétique, la régulation de l'appétit, l'état émotionnel  
et l'implication du récepteur GPR120

Présentée par :

Stéphanie Auguste

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Claude LAVOIE Ph.D., Président-rapporteur

Stephanie FULTON Ph.D., Directeur de recherche

Chantal BEMEUR Dt.P., Ph.D., Membre du jury

Dave St-AMOUR Ph.D., Examineur externe

Lise CODERRE Ph.D., Représentante du Doyen de la FES

## Résumé

L'obésité est un facteur de risque lié à des problèmes physiques, émotionnels et comportementaux. Aujourd'hui, l'alimentation est composée d'un régime typiquement occidental «Western diet» qui est riche en acides gras saturés (AGS) et pauvre en acides gras polyinsaturés (AGPI) tel que les oméga-3 (N-3) et occasionnant un déséquilibre du ratio alimentaire N-6/N-3. Ce déséquilibre est une des causes de la prévalence des maladies mentales y compris celles des troubles de l'humeur et de l'anxiété. L'acide docosahexaénoïque (ADH, 22: 6 n-3) est l'acide gras (AG) le plus abondant dans le cerveau et son accumulation est particulièrement élevée pendant la période périnatale. Il joue un rôle important dans le développement neuronal et d'autres fonctions du cerveau tel l'apprentissage et la mémoire. Des perturbations de l'environnement périnatal peuvent influencer à très long terme l'avenir de la descendance en la rendant plus susceptible de développer des problèmes d'obésité dans un contexte nutritionnel riche. On ignore cependant si le déficit alimentaire chez la mère et particulièrement en ADH aura un impact sur la motivation alimentaire de la progéniture. L'objectif principal de cette thèse est d'étudier le rôle potentiel des N-3 sur la balance énergétique, la motivation alimentaire, la dépression et le niveau d'anxiété des descendants de souris mâles adultes assujetties à une alimentation riche en gras. Nos données ont démontré qu'un régime maternel déficitaire en ADH durant la période périnatale incitait la descendance à fournir plus d'effort afin d'obtenir un aliment palatable. Ceci entraînerait un dérèglement de l'homéostasie énergétique en augmentant le gain de poids et en diminuant l'activité locomotrice tout en exacerbant le comportement de type anxieux dès que les souris sont exposées à un milieu obésogène.

Les acides gras libres (AGL) sont des nutriments essentiels fonctionnant comme des molécules de signalisation dans le cerveau en ayant des récepteurs qui jouent un rôle important dans le contrôle du métabolisme énergétique. Parmi eux, on distingue un récepteur couplé à la protéine G (GPCR), le GPR120. Ce récepteur activé par les AGPI  $\omega$ -3 intervient dans les mécanismes anti-inflammatoires et

insulino-résistants via les N-3. Une mutation dans le gène GPR120 occasionnée par une réduction de l'activité de signalisation du gène est liée à l'obésité humaine. L'objectif premier de cette deuxième étude était d'évaluer l'impact de la stimulation pharmacologique de GPR120 dans le système nerveux central (SNC) sur l'alimentation, les dépenses d'énergie, le comportement de type anxieux et la récompense alimentaire. Nos résultats démontrent qu'une injection centrale aiguë d'agoniste GPR120 III réduit la prise alimentaire *ad libitum* et la motivation alimentaire pour un aliment riche en gras et en sucre; ainsi que les comportements de type anxieux. L'injection centrale chronique (21 jours) de ce même agoniste GPR120 III transmis par une pompe osmotique a démontré que les souris placées sous diète hypercalorique (HFD n'ont présenté aucune modification lors de la prise alimentaire ni de gain de poids mais qu'il y avait comparativement au groupe de véhicule, une réduction du comportement de type anxieux, que ce soit dans le labyrinthe en croix surélevé (LCS) ou dans le test à champ ouvert (OFT).

L'ADH est reconnu pour ses propriétés anorexigènes au niveau central. De plus, la stimulation des récepteurs de GPR120 au niveau du cerveau avec un agoniste synthétique peut produire un effet intense intervenir sur le comportement lié à l'alimentation des rongeurs. Trouver une approche visant à contrôler à la fois la neuroinflammation, la récompense alimentaire et les troubles émotionnels aiderait assurément au traitement de l'obésité et du diabète de type 2.

**Mots-clés** : Déficit périnatal, oméga-3, GPR120 agoniste, anxiété, récompense alimentaire.

## **Abstract**

Obesity is a risk factor for metabolic and mood disorders. The increasing abundance of the "Western diet" that is rich in saturated fatty acids (SFA) and low in polyunsaturated fatty acids (PUFA) omega-3 (N-3) can generate a physiological imbalance in the ratio of N-6/N-3 fatty acids. Such an imbalance has also been implicated in the increased prevalence of mood disorders and metabolic diseases. Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3), the most abundant fatty acid (FA) in the brain is accumulated not only during the post-natal period but also during the perinatal period. It plays an important role in neuronal development and other brain functions such as learning and memory. Disturbances of the perinatal environment can influence the sustainable future of the offspring, making it more likely to develop obesity in rich nutritional context. Some data suggest that an inadequate maternal intake of N-3 during pregnancy and the perinatal period may cause an increase in appetite signalling in the offspring as well as an increase rate of neurological and cardio-metabolic disease. It is not known if maternal dietary deficiency in N-3 will have an impact on food motivation of the offspring. The main objective of this thesis was to study the potential effect of dietary deficiency of DHA during the perinatal period on energy balance, food motivation and the anxiety-like behavior of adult male mouse offspring placed on HFD. Our data showed, as expected, that the maternal DHA deficient diet during perinatal period encouraged offspring to work harder to get a palatable food, entailed a dysregulation of energy homeostasis by increasing the body weight and reducing locomotor activity and exacerbated the anxiety-like behavior once they were exposed to an obesogenic environment.

Free fatty acids (FFA) are essential nutrients that they also function as signalling molecules in the brain and have receptors that play a significant role in the control of energy metabolism. Among them is GPR120, also known as N-3 FA receptor, a g-protein coupled receptor that is reportedly activated by PUFA and shown to mediate the anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects of N-3 FA. A mutation in the GPR120 gene that is associated with reduced GPR120 signalling activity is linked to human obesity. The objective of our second study was to test the impact of pharmacological GPR120 stimulation in the CNS on feeding, energy expenditure, anxiety-like behavior and food reward. Our results showed that an acute central injection GPR120 agonist III: reduced *ad libitum* food intake and the rewarding effect for high fat, high sugar food; produced a significant decrease in the anxiety-like behavior. While mice with the chronic injection (21 days) of *GPR120 III agonist pump* on HFD didn't show any modification in food intake or body weight gain, but show a reduction of anxiety-like behavior in Elevated plus maze (EPM) and open-field test (OFT) compare to the vehicle group.

DHA is notified to have an anorectic action. Furthermore, stimulation of GPR120 receptors with synthetic agonist may cause an acute and profound effect on food related behavior in rodents. To find an approach that aims to control neuroinflammation, food reward and emotional disorders would greatly assist the treatment of obesity and type 2 diabetes.

**Keywords:** dietary deficiency, omega-3 fatty acid, GPR120, anxiety, food motivation, reward, high-fat diet

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	i
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xiv
Avant-propos.....	xvii
Chapitre 1 : Contexte théorique.....	1
1.1. Description de la balance énergétique.....	2
1.2 Contrôle central de la balance énergétique.....	4
1.2.1 Contrôle homéostatique.....	5
1.2.2 Contrôle hédonique.....	7
1.3. Signaux qui modifient la balance énergétique.....	11
1.3.1. Signaux hormonaux périphériques.....	12
1.3.2. Signaux hormonaux centraux.....	14
1.3.2.1. Neuropeptides.....	15
1.3.2.2. Neurotransmetteurs.....	15
1.3.3. Nutriments.....	17
1.3.3.1. Les glucides.....	17
1.3.3.2. Les protéines.....	18
1.3.3.3. Les lipides.....	18
1.3.4. Signaux liés aux facteurs émotionnels.....	19

1.3.4.1. L'anxiété .....	20
1.3.4.2. La dépression .....	25
1.3.5 Signaux externes .....	28
1.4. Acides Gras polyinsaturés.....	32
1.4.1. Classification.....	32
1.4.2. Sources .....	34
1.4.3. Rôles .....	35
1.4.4. Voies métaboliques.....	35
1.4.5 Effets bénéfiques connus pour la santé.....	37
1.4.5.1. Les oméga-3 et les maladies cardiovasculaires, diabète, obésité.....	37
1.4.5.2 Les oméga-3 et l'anxiété, la dépression, les troubles neurologiques.....	39
1.4.5.3. Importance ratio N-6/ N-3 .....	41
1.4.6. Importance pour le cerveau.....	43
1.4.6.1. Statut lipidique cérébral .....	44
1.4.6.2 Mode de transport .....	44
1.4.6.3 Synthèse dans le cerveau .....	47
1.4.6.4 Développement cérébral .....	49
1.4.6.5 Liens avec le système des neurotransmetteurs.....	50
1.4.7 Mécanismes d'actions via le GPR120 et GPR40.....	51
1.4.7.1 Les RCPGs ou GPCRs.....	51
1.4.7.2 Famille des RCPGs .....	52
1.4.7.3 Structure et fonctions des RCPGs.....	52
1.4.7.4 Cycle de signalisation .....	53
1.4.7.5 La protéine G .....	55
1.4.7.6 Rôles physiologiques du RCPG120.....	56
Chapitre 2 : Objectifs et approches expérimentales.....	59
2.1. Origine du projet.....	60
2.2. Objectifs généraux et hypothèses.....	61
2.3. Méthodologie .....	63
2.3.1. Description du projet.....	63



2.3.1.1. Approche systémique.....	64
2.3.1.2. Approche centrale .....	71
2.3.1.3. Matériel de canulation.....	78
2.3.1.4. Validation de l'emplacement de la canule .....	80
2.3.2. Diètes .....	81
2.3.3. Devis de recherche .....	81
2.3.3.1 Approche systémique.....	82
2.3.3.2 Approche centrale .....	83
2.3.4. Mesure des variables dépendantes .....	84
2.3.4.1. Mesure du poids corporel.....	84
2.3.4.2. La composition corporelle .....	84
2.3.4.3. Mesure de la prise alimentaire .....	85
2.3.4.4. Évaluation du comportement de type anxieux et dépressif .....	88
2.3.4.4.1. Le labyrinthe en croix surélevé (LCS).....	89
2.3.4.4.2. Le test à champ ouvert .....	91
2.3.4.4.3 Le test de suspension caudale (TST) .....	93
2.3.4.5. Les modifications de la dépense énergétique.....	95
2.3.4.6. Évaluation du métabolisme glucidique et la tolérance à l'insuline de la progéniture .....	96
2.3.5. Collecte et traitement des données.....	97
2.3.6. Analyses statistiques .....	98
2.3.7. Considération éthique .....	98
 Chapitre 3: Perinatal deficiency in dietary omega-3 fatty acids potentiates adiposity and suppresses locomotor activity on a high-fat diet.....	 99
 Chapitre 4: Central agonism of GPR120 / FFA4 inhibits food intake, food reward and anxiety-like behaviour.....	 123
 Chapitre5 : Discussion générale.....	 152
5.1. Rappel des objectifs .....	153
5.2. Rappel des principaux résultats .....	154

5.3. Implications de la carence en oméga 3 .....	156
5.3.1. Effets sur la reproduction et le poids des animaux .....	156
5.3.2. Effets sur la prise alimentaire .....	157
5.3.3. Effets sur la réponse hyperphagique après 3 jours de restriction alimentaire.....	158
5.3.4 Effets sur la motivation alimentaire.....	160
5.3.5. Effets sur la mémoire et l'apprentissage.....	162
5.3.6. Constituants gras des diètes adéquate et déficitaire en oméga-3.....	164
5. 3.7. Effets sur la composition corporelle, les dépenses énergétiques .....	165
5.3.8. Effets sur le métabolisme glucidique et la tolérance à l'insuline.....	167
5.3.9. Comportement de type anxieux et dépressif.....	169
5.4. Implications de la stimulation aiguë et chronique du GPR120.....	173
5.4.1. Effets sur la prise alimentaire et la motivation alimentaire .....	173
5.4.2. Effets sur le bilan énergétique.....	177
5.4.3. Le comportement émotionnel de type anxieux une fois que les souris seraient exposées à une diète obésogène.....	179
5.5. Forces et faiblesses de cette étude .....	182
 Chapitre 6 : Conclusion générale et perspectives .....	 185
6.1. Conclusion .....	186
6.2. Perspectives.....	188
 Bibliographie.....	 192
 Annexe 1 : Poids des souris au sevrage .....	 224
 Annexe 2 : Composition de la diète régulière de base Chow .....	 225
 Annexe 3 : Composition de la diète hypocalorique .....	 226
 Annexe 4 : Composition de la diète hypercalorique.....	 227
 Annexe 5 : Mesure de l'apprentissage et de la mémoire .....	 228

Annexe 6 : Réponse hyperphagique post restriction alimentaire.....	229
Annexe 7 : Métabolisme glucidique .....	230
Annexe 8 : Fiche technique pour tests OGTT et IP-ITT .....	232
Annexe 9 : Fichier d'acceptation de protocole .....	233

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Représentation des différents tests et modèles d’anxiété développés chez les rongeurs.....	24
Tableau 2: Différents ingrédients composent les diètes adéquate et déficitaire en N-3.....	71

## Liste des figures

Figure 1: Illustration de la balance énergétique.....	3
Figure 2 : Localisation de l'hypothalamus dans l'encéphale.....	6
Figure 3: Principaux facteurs impliqués dans la prise alimentaire. ....	8
Figure 4 : Détection des signaux métaboliques par le circuit neuronal dopaminergique. ....	12
Figure 5 : Périodes critiques du développement au cours desquelles se produirait la programmation intra-utérine. D'après [Source : d'après Fowden et al. [220]]. ....	29
Figure 6 : Rôle de l'environnement foeto-maternel sur la programmation métabolique en faveur de la réserve des lipides .....	31
Figure 7 : Structure des principales familles d'acides gras .....	32
Figure 8 : Formule chimique des acides gras polyinsaturés. ....	33
Figure 9 : Biosynthèse des acides gras d'origines animale et végétale. ....	36
Figure 10 : Conséquences d'un apport alimentaire déséquilibré en acide linoléique/acide $\alpha$ -linoléique sur la biosynthèse des AGPI à longues chaînes .....	43
Figure 11 : Représentation schématique de la barrière hématoencéphalique. ....	45
Figure 12 : Teneurs en DHA et en AA dans les structures cérébrales de la souris. ....	48
Figure 13 : Représentation schématique en deux dimensions des récepteurs couplés à la protéine G dans la membrane. ....	52
Figure 14 : Vue schématique des étapes membranaires de transduction du signal par les RCPG après activation par un ligand agoniste.....	53
Figure 15 : Représentation schématique sur une échelle de temps du déroulement des expériences de l'approche systémique.....	65
Figure 16 : Représentation schématique du déroulement des expériences pendant la stimulation centrale pharmacologique aiguë. ....	73
Figure 17 : Représentation schématique du déroulement des expérimentations pendant la stimulation centrale pharmacologique chronique à l'aide d'une pompe osmotique.....	76
Figure 18: Une pompe osmotique ALZET et les composants de la perfusion cérébrale .....	80
Figure 19: <i>Operant Chamber</i> .....	86
Figure 20: Illustration du Labyrinthe en croix surélevé. ....	91

Figure 21: Illustration de <i>l'Open-field</i> .....	93
Figure 22: Représentation schématique de la mobilité et l'immobilité dans le test de suspension caudale.....	94

## Liste des abréviations

AA : Acide Arachidonique

ACh: Acétylcholine

ADH : Acide Docosahexaénoïque

AEA: Anandamide

AEP : Acide Eicosapentaénoïque

AG : Acides gras

AGI : Acides gras insaturés

AGL : Acides gras libres

AGLC : Acides gras à longue chaîne

AGMI : Acides gras monoinsaturés

AGPI : Acides gras polyinsaturés

AGPI-LC : Acides gras polyinsaturés à longue chaîne

AGRP: Agouti-related peptide

AGS: Acides gras saturés

ALA : Acide alpha linoléique

AMY : Amygdale

ANREF: Apport nutritionnel de référence

AP: Activité physique

APE: Acide pentahéxaénoïque

ARNm: Acide ribonucléique messager

BDNF: Brain derived neurotrophic factor

B-FABP: brain fatty acid binding protein

BHE: Barrière hématoencéphalique

CPF: Cortex pré-frontal

CRCHUM: Centre de recherche du centre hospitalier de l'université de Montréal

CREB: cAMP response element binding protein

CRH: Corticotropin Releasing Hormone

CRSNC: Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada

C57/Bl6: C 57 Black 6

DA: Dopamine

DAnergique : Dopaminergique

DGLA: Acide dihomom- $\alpha$ -linoléique

DMLA: Dégénérescence maculaire liée à l'âge

DRI: Dietary reference intakes

DS: Dorsal striatum (Striatum Dorsal)

DT2: Diabète de type 2

eCB : Endocannabinoïde

Echo MRI: Echographie par résonance magnétique

ECS: Endocannabinoids System, système endocannabinoïdes

E-FABP: Epithelial fatty acid bounding protein

E0 : Embryonique 0 (Jour embryonique 0)

EPM : Elevated plus maze

FABP: Fatty acid binding proteins

FATP: Fatty acid transporter proteins

FC max: Fréquence cardiaque maximale

FDA: Food and drug administration

BLA: Noyau basolatéral de l'amygdale	FESP : Faculté des études supérieures et post doctorales
CART: Peptides reliées à la cocaïne et aux amphétamines	FFA: Free fatty acid
CB1R: Récepteur cannabinoïde 1	GABA: $\gamma$ -aminobutyric acid
CB2R: Récepteur cannabinoïde 2	GD0: Gestational day 0 (Jour gestationnel 0)
CCK: Cholecystokinine	GDP: Guanosine diphosphate
CH3: Groupement méthyl	GDS: Geriatric Depression Scale
CLAMS: Comprehensive Laboratory Animal Monitoring System	GIP: Glucose dependent insulintropic polypeptide
CLAX: CLAMS data eXamination Tool	GLAST: Glutamate aspartate transporter
COOH: Groupement carboxyl	GLP: Glucagon-like peptide
COX: Cyclooxygénases	GLP-1: Glucagon-like peptide 1
GLT-1: Glucose transporter 1	NPY: Neuropeptide Y
GPR40: G protein-coupled receptor 40	OMS : Organisation mondiale de la santé
GPR120: G protein-coupled receptor 120	P0 : Post natal 0 (J0 post natal)
GTP: Guanosine triphosphate	P21 : Post natal 21 (J21 post natal)
HC: Hippocampe	P42 : Post natal 42 (J42 post natal)
H-FABP: Heart fatty acid binding protein	PCR : Protein Chain Reaction
HFD: High fat diet	PG : Prostaglandine
HPLC:High-Performance LiquidChromatography	PGE2 : Prostaglandine E2
Hyp: Hypothalamus (HT)	PGI : Prostacyclines
HPLC-MS/MS: HPLC- tandem Mass Spectrometry	PL : Phospholipides
ICV : Intracérébroventriculaire	POMC : Pro-Opiomélanocortine
IMC : Indice de masse corporelle	PP : Polypeptide pancréatique
IL : Interleukine	PPA : Parités de pouvoir d'achat
IL-6 : Interleukine 6	PPAR : Peroxisome proliferator activated receptor
LA : Acide linoléique	PVN : Noyaux para ventriculaires



LH : Lateral hypothalamus  
 LOX : Lipoxygénases  
 LPA : Acide lysophatidique  
 LPS : Lipopolysaccharide  
 LT : Leucotriènes  
 MA : Maladie d'Alzheimer  
 MB : Métabolisme de base  
 MCH: Hormone concentratrice de la mélanine  
 MCV : Maladies cardiovasculaires  
 Mfsd2a : Major facilitator superfamily domain containing protein 2 a  
 MS : Mass spectrometry (Spectromètre de masse)  
 $\alpha$ -MSH: Hormone stimulante de l'alpha-mélanocyte  
 MTC : Monocarboxyl  
  
 N-3 ad: N-3 adéquat  
 N-3 def : N-3 déficitaire  
 NAPE: N-acyl phosphoéthanolamine  
 NAc: Noyau accumbens  
 NH2: amino terminal  
 NT : Neurotransmetteur  
 NTS : Noyau du tractus solitaire  
  
 NT : Neurotransmetteurs  
 VMN : Noyau ventromédian  
 VMAT2 : Transporteurs vésiculaires des monoamines 2  
  
 PYY<sub>3-36</sub>: Peptide YY<sub>3-36</sub>  
 QI : Quotien intellectuel  
 RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G  
 RER : Ratio d'échange respiratoire  
 S1P : Sphingosine 1-phosphate  
 SA : Semaine d'âge  
 SN : Substantia negra  
 SNA : Système nerveux autonome  
  
 SNC : Système nerveux central  
 SNS : Système nerveux sympathique  
  
 TAB1: TGF- $\beta$  activated kinase-1 binding protein-1  
 TAK1: TGF- $\beta$  activated kinase-1  
  
 TDAH : Troubles du déficit de l'attention avec hyperactivité  
 TG: Triglycérides  
 THA: Acide tétracosahexaénoïque  
 TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor  $\alpha$   
 TOC : Troubles obsessionnels compulsifs  
 TPA : Acide tétracosapentaénoïque  
 TRH: Hormone libératrice de la thyrotropine  
 VO<sub>2</sub>max : Volume d'oxygène maximal consommé  
 VCO<sub>2</sub> : Volume dioxyde de carbone

VO<sub>2</sub> : Volume d'oxygène

VP : Ventral Pallidum

VTA : Ventral tegmental area (Aire  
tegmentale ventrale)

JE DÉDIE CET OUVRAGE À MON FILS, CELUI POUR QUI JE ME DÉPASSE CHAQUE  
JOUR DE MA VIE ...

## Remerciements

Je désire exprimer ma plus sincère reconnaissance à tous les membres du jury qui ont eu la générosité d'évaluer ma thèse, d'y avoir apporté un regard impartial et de me faire l'honneur d'assister à ma soutenance.

Je suis des plus honorée que le professeur Jean-Claude Lavoie ait accepté d'évaluer l'ensemble de ma thèse et de la présider.

C'est un honneur pour moi que la professeure Chantal Bémour ait accepté de siéger en tant que membre du jury et sur mon comité de parrainage. Je tiens à le remercier très chaleureusement.

J'adresse également mes très sincères remerciements au professeur Dave St-Amour, examinateur externe de cette thèse. Je suis honorée de pouvoir partager les résultats avec lui.

À la représentante du doyen, la professeure Lise Coderre, j'adresse mes salutations les plus distinguées et je la remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de représenter prestigieusement le doyen de la faculté de médecine.

Je renouvelle mes sincères remerciements à ma directrice, la professeure Stephanie FULTON, pour l'inspiration et la direction de ce travail de travail et de s'être chargée de ma formation. Il est difficile en quelques mots de lui rendre hommage. Je tiens toutefois à la reconnaître pour ses qualités scientifiques et personnelles qu'elle a démontrées pendant toutes ces années d'études. Je tiens à lui rappeler que j'ai véritablement apprécié sa rigueur, que ce

soit à la paillasse ou au bureau. Notre histoire a débuté bien avant mon doctorat lorsqu'elle a supervisé mes travaux de maîtrise. Je la remercie d'avoir bien voulu m'accorder toute sa confiance dans la réalisation de ma thèse et de m'avoir enseigné avec patience l'art de la communication scientifique par l'écriture d'articles en anglais (ce qui, je dois l'avouer n'était pas chose aisée).

Je remercie également mes collègues de travail que j'ai côtoyés et qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ma thèse. Je cite en particulier: Sandeep Sharma, Maria-Fernanda Fernandes, Cécile Hryhorczuk, Alexandre Fisette, tous co-auteurs de mes articles scientifiques.

De peur d'en oublier, je remercie en général toutes les personnes des différents labos du CRCHUM qui m'ont aidée de près ou de loin, tant au niveau de la recherche que sur le plan humain. Merci aux personnes que j'ai côtoyées avant d'entamer cette thèse et qui m'ont encouragé à la faire et à devenir chercheure. Merci aussi à tous les doctorants des autres laboratoires, les «rats de labo comme moi» et stagiaires qui ont croisée ma route et grâce à qui ce fut moins contraignant pénible de venir travailler même pendant les fins de semaine.

Je tiens à remercier le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour son soutien financier à la réalisation du projet, le département de nutrition de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal pour les différentes bourses et la Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP) pour la bourse d'exemption des frais supplémentaires de scolarité. Merci également à d'autres personnes du département de nutrition, particulièrement la professeure Irène STYCHAR qui a été pour moi un modèle et une inspiration.

À toi, maman, merci d'avoir toujours été présente. Je te serai à jamais reconnaissante car je sais que cela m'a demandé d'énormes sacrifices énormes. Je ne saurais donner une meilleure éducation à mon fils. Chapeau!

À toi papa, je veux que tu sois toujours fier de ta fille chérie car je suis plus que fière de t'avoir comme papa. Merci pour le réconfort que maman et toi vous m'apportez et pour le regard que vous posez sur moi. Merci d'avoir cru en moi, de vous être tant intéressés à ma thèse et aux oméga-3 ainsi qu'à mes projets passés, présents et à venir.

## **Avant-propos**

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre des programmes de recherche sur la «neuroscience nutritionnelle» et se situe à l'interface de la neuroscience et de la nutrition. L'amalgame de ces deux disciplines fut particulièrement intéressante tant au niveau de la problématique qu'au niveau de l'enrichissement scientifique personnel. Ce travail a débuté en janvier 2010 au Technopole Angus du Centre de Recherche de Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) pour se terminer, suite au déménagement, au nouveau bâtiment du CRCHUM. Le travail fut rendu possible grâce au soutien financier du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), aux différentes bourses de la Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP) de l'université de Montréal, au département de nutrition de la faculté de médecine de l'université de Montréal et de L'Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA) pour l'octroi de bourse à la maîtrise.

### ***Contexte général***

Reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en tant que une maladie en 1997 [1], l'obésité est en constante évolution surtout dans les pays industrialisés. Selon l'OMS, le surpoids et l'obésité sont la cinquième cause mondiale de mortalité. Ceci représente un problème majeur en santé publique puisqu'il est responsable d'environ 3.4 millions de décès annuellement à travers le monde [2]. La situation au Canada est moins dramatique mais tout de même alarmante. Entre 2007 et 2009, la prévalence de l'obésité fut estimée à 24.1 % de la population adulte dont 3.1 % d'obésité de classe III [3]. Les prévisions 2015 faisaient état de 2,3 milliards d'adultes en surplus de poids et de 700 millions d'obèses dans le monde

[4] et cette pandémie n'épargne pas les enfants. C'est pourquoi, le taux croissant d'enfants de moins de 5 ans en surpoids dans le monde avoisine les 20 millions [5]. Les enfants dans les sociétés occidentales, en plus d'un mode de vie sédentaire accrue, sont exposés à une grande variété d'aliments riches en gras et en calories qui contribuent au développement de l'obésité. En effet, la consommation d'aliments obésogènes riches en gras et en sucre est associée aux changements dans les circuits de récompense du cerveau contribuant aux besoins grandissant d'en consommer souvent et davantage [6, 7]. Ces enfants sont plus susceptibles de devenir des adultes obèses et ce, peut-être en partie en raison des habitudes et des goûts alimentaires développées pendant l'enfance [8].

Le surpoids et l'obésité sont caractérisés par l'accumulation anormale ou excessive de masse adipeuse dont la répartition anatomique montre des variations considérables parmi les personnes ayant un excès de poids. Cette accumulation de gras se développe plus particulièrement au niveau du tissu adipeux abdominal (obésité androïde) et elle est souvent accompagnée d'inflammation systémique chronique augmentant les risques de développer des maladies cardiovasculaires (MCV) [9, 10], le diabète [11] et la dépression [12], comparativement à une répartition plus uniforme et périphérique de la masse adipeuse (obésité gynoïde) Després and Lemieux [13]. L'obésité a coûté 700 millions de dollars aux Québécois en 1999-2000, représentant à cette époque 5,8 % du budget consacré à la santé. Cette même étude a été estimée à plus de 800 millions de dollars en pertes de productivité [14]. Face à ce fardeau socioéconomique, la prévention de l'obésité s'avère nécessaire pour ralentir l'évolution des maladies chroniques.



Des données épidémiologiques suggèrent que l'obésité est associée à un risque accru de troubles dépressifs [15, 16] et de troubles mentaux qui se retrouve le plus souvent dans les pays industrialisés tels que les troubles de l'humeur et l'anxiété [17]. L'anxiété est la maladie mentale la plus répandue qui affecte les adultes canadiens chez environ 9 % des hommes et 16 % des femmes au cours d'une période d'un an au Canada [18, 19]. Selon des enquêtes épidémiologiques réalisées dans divers pays, la prévalence des troubles anxieux se situe autour de 10,6 % sur une période de 12 mois et de 16,6 % à vie [20]. L'OMS considère la dépression comme étant une maladie multifactorielle et par surcroît, un problème majeur en santé publique [21]. Classée parmi les 10 grandes pathologies, d'ici 2020 elle deviendra la deuxième cause de morbidité [22] touchant environ 350 millions de personnes [23]. La dépression est associée au fardeau économique élevé dans notre société, où l'utilisation des antidépresseurs a été rapportée chez 20 à 45 % des individus déprimés. Cette situation entraîne des coûts moyens annuels de traitement variant de 108 à 305 US\$ PPA (parités de pouvoir d'achat) [24]. L'importance de la prise de poids en lien avec l'obésité et l'humeur dépressive est suggéré par la corrélation négative entre l'indice de masse corporelle (IMC) et l'état émotionnel [25]. De plus, le risque de dépression chez les personnes obèses semble dépendre de leur dysfonctionnement métabolique [26] puisque les personnes obèses et métaboliquement saines sont beaucoup moins susceptibles de développer la dépression [27]. Un point ici important de noter est l'association entre l'obésité et la dépression qui est bidirectionnelle [28]. Des modifications dans les circuits neuronaux contrôlant l'état émotionnel peuvent survenir avec le gain de poids et l'obésité, de même que l'humeur dépressive peut conduire à la suralimentation afin de compenser un état affectif réduit [29, 30] conduisant à de mauvaises habitudes alimentaires, à un gain de poids et au diabète du type 2 [31].

Le diabète du type 2 (DT2) est une maladie complexe qui touche environ 360 millions d'individus dans le monde avec une prévalence estimée à 450 millions d'ici 2030. Environ 2,8 millions de Canadiens en sont atteints, ce qui représente 6 à 7 % de la population [32]. Cette maladie est associée à de graves complications à long terme telles que la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie; cela représente un facteur de risque majeur pour les MCV et les ACV. Les coûts annuels de soins de santé du diabète au Canada sont estimés à 13,2 milliards de dollars. Selon l'OMS, 44 % du fardeau du diabète, 23 % des coronaropathies ischémiques sont attribuables au surpoids et à l'obésité [33].

Outre la mise en place de stratégies permettant la réduction des coûts socio-économiques de l'obésité, du diabète et des pathologies neurologiques, l'exploration des comportements émotionnels et de motivation alimentaire s'avère essentiel dans la lutte contre les maladies chroniques liées à la nutrition.

### ***Problématique***

L'obésité, le DT2 et les affections neurologiques sont des maladies chroniques représentant les principales causes de morbidité et de mortalité dans presque tous les pays du monde. Après de nombreuses années d'évolution et malgré les progrès effectués, la science poursuit ses recherches afin de mieux comprendre le système pouvant s'adapter afin de permettre d'assurer l'apport d'énergie nécessaire à la survie de tout organisme. On commence également à mieux saisir comment les pathologies neurologiques comme l'anxiété et la dépression peuvent avoir une influence sur la balance énergétique. Toutefois, les mécanismes neuro-métaboliques à la base de cette physiopathologie ne sont pas encore précis. Il est d'autre part bien établi que les facteurs émotionnels peuvent influencer la prise

alimentaire en ce sens que la forte prévalence de l'anxiété puisse être associée à la détérioration de l'alimentation occidentale [17]. Ces troubles anxieux ont un impact majeur sur l'économie [34] puisqu'ils occasionnent des pertes de productivité au sein de notre société en provoquant à la fois l'absentéisme au travail et des pertes d'emploi . Dans une étude menée auprès de différentes familles de diverses races, Dong et al. ont établi en 2004, le lien entre l'obésité extrême et un risque accru de la dépression et cela même après le contrôle de maladies physiques chroniques, de la dépression familiale et des facteurs de risque démographiques [35]. En effet, les informations sur les aspects émotionnels et cognitifs de la prise alimentaire sont contrôlées en grande partie par les circuits cortico-limbiques ainsi que par les noyaux du mésencéphale pouvant exercer une puissante influence sur le comportement alimentaire [36].

Cette régulation du contrôle de la prise alimentaire qui entre dans le cadre général de régulation de l'homéostasie énergétique ne dépend pas uniquement des signaux émotionnels (stress, anxiété, dépression), mais également des signaux environnementaux, nerveux, endocriniens et métaboliques de faim ou de satiété [37, 38]. Ces différents signaux provenant de diverses parties du corps sont très sensibles aussi bien à l'apport énergétique qu'aux dépenses touchant le système nerveux central (SNC). Ainsi, le faible coût des dépenses d'énergie pour accéder à la nourriture, la diminution de l'activité physique, la consommation accrue de régimes occidentaux riches en gras et en sucre [39, 40], la qualité et la quantité des aliments ingérés mais avant tout la période du développement durant laquelle ils sont consommés, sont autant de facteurs contribuant au développement de l'obésité et du DT2.

Il existe des nutriments tels que les acides gras polyinsaturés (AGPI) qui jouent un rôle important pour la santé. Les effets bénéfiques des AGPI oméga-3 (N-3) ont été démontrés vers 1970 auprès des populations consommant des fruits de mer et en particulier chez les Eskimos, qui présentaient une faible prévalence des MCV [41]. Ces AGPI N-3 comprennent l'acide docosahéxaénoïque (ADH, 22:6 n-3) qui est abondant dans le cerveau [42] et l'acide éicosapentaénoïque (AEP, 20:5n-3) qui a une durée de vie très limitée dans le cerveau [43, 44]. L'ADH s'accumule pendant la période périnatale au moment de la mise en place des réseaux neuronaux [45] et il demeure un élément important pour les fonctions neuronales de mémoire et d'apprentissage.

Bien que l'effet protecteur cardiovasculaire des acides gras (AG) N-3 d'origine marine soit principalement dû à l'ADH, l'AEP a également des bienfaits cardioprotecteurs par ses effets anti-inflammatoires [46, 47]. Malgré les résultats controversés, plusieurs études ont démontré les bienfaits des AGPI de la famille des N-3 pour la santé mentale. Parmi celles-là, une méta-analyse compréhensive d'essais cliniques aléatoires [48] menée sur le rôle des N-3 et le traitement des troubles dépressifs a démontré que l'utilisation d'AGPI N-3 en tant qu'agents thérapeutiques est efficace chez les patients ayant un diagnostic de dépression majeure et sur des patients dépressifs sans un diagnostic de dépression majeure. Une autre étude a illustré que la teneur plasmatique élevée en AEP est associée à un moindre risque de symptômes dépressifs, surtout parmi ceux qui prennent des antidépresseurs [49].

L'anxiété a une relation de comorbidité très significative avec la dépression. Une étude a démontré que des niveaux élevés d'AEP réduisent le niveau d'anxiété chez des toxicomanes [50]. Ceci s'explique par le fait que les toxicomanes et les alcooliques sont prédisposés à

rechuter en raison de l'augmentation de leur niveau d'anxiété. Ainsi, l'administration d'une dose élevée d'AEP (supérieure à 2 g/jr) réduit significativement l'anxiété par rapport à ceux recevant un placebo [51, 52].

L'insuffisance des AGPI N-3 au cours du développement pré et néonatal réduit l'accumulation de l'ADH dans le cerveau en développement [53]. Des études suggèrent que la diminution de l'apport alimentaire en AG, plus précisément les N-3 en période postnatale, joue un rôle majeur sur les taux élevés de maladies neurologiques [54] et métaboliques. Une méta-analyse a également signalé que les essais centrés sur la dépression périnatale démontraient une efficacité réduite des AGPI N-3 sur les symptômes dépressifs [48] et ce probablement liée au fait que la supplémentation en AGPI augmentait la demande du développement du fœtus pendant la grossesse et durant l'allaitement du nouveau-né plutôt que de contribuer à l'efficacité thérapeutique des symptômes dépressifs [55]. De manière plus générale, nous pouvons constater qu'un déséquilibre des apports en AGPI N-6 et N-3 n'est pas sans conséquences sur l'ensemble des systèmes physiologiques de notre organisme puisqu'un ratio N-6/N-3 élevé favorise la fréquence de nombreuses maladies chroniques telles que les maladies inflammatoires [56], les MCV [57], le diabète, l'obésité [58] et la dépression [59]. Toutefois, l'effet d'une diète carencée en N-3 durant la période périnatale sur la balance énergétique et plus particulièrement sur la motivation alimentaire demeure à ce jour inconnu.

Certains récepteurs spécifiques aux AGPI couplés à des récepteurs de protéine G ont été identifiés et étudiés en tant que cibles à actions thérapeutiques [60-62]. Des récepteurs de GPR40 (FFAR1) et le GPR120 (FFAR4) ont été placés à la surface cellulaire et ont été stimulés par les AGPI à longue chaîne, dont les N-3 [63, 64]. Le GPR40 se retrouve

principalement au niveau pancréatique où il joue un rôle dans la sécrétion d'insuline [64] mais également au niveau intestinal régularisant la sécrétion d'hormones gastro-intestinales contrôlant la prise alimentaire [65, 66]. Sa présence au niveau du cerveau a été longtemps controversée, mais de récentes études semblent la confirmer [67, 68]. Le GPR120 est pour sa part largement exprimé dans un certain nombre de tissus tel que le tissu adipeux blanc [69-71], les poumons, le colon [63] et différents types de cellules de défense de l'organisme comme les macrophages [71]. Il joue un rôle important dans l'équilibre de divers mécanismes physiologiques tels que la régulation des processus d'adipogénèse et de lipogénèse, d'inflammation, d'intolérance au glucose [63, 69, 70, 72], de contrôle de l'appétit par régulation de la sécrétion d'hormones gastro-intestinales comme la cholécystokinine [72-75]. Le pouvoir anti-inflammatoire du GPR120 a été démontré *in vitro* par la suppression des marqueurs pro-inflammatoires et par la réduction de l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux en supprimant des marqueurs pro-inflammatoires via les AGPI  $\omega$ -3 [71]. En d'autres termes, le GPR120 joue un rôle fondamental dans le contrôle de la balance énergétique chez l'homme et la souris [76] à l'égard de son expression au niveau du système central nerveux quoiqu'il soit encore très peu connu. Il a toutefois été exprimé dans le cerveau et il est impliqué dans les effets anorexiques et anti-inflammatoires de l'hypothalamus via les AGPI  $\omega$ -3 [77, 78]. Une variante humaine du gène GPR120, (p. R27OH) qui inhibe les voies de signalisation du GPR120, est liée à l'augmentation des risques de développer l'obésité [70]. Malgré ces informations, on ne connaît pas les effets du GPR120 au niveau du SNC et si son activation centrale produirait un effet sur la balance énergétique.

De nombreuses questions demeurent toujours sans réponses et les objectifs de ce travail de recherche visent à fournir des pistes de solutions pour le traitement des pathologies chroniques.

### ***Plan du manuscrit***

Dans le but d'établir le contexte dans lequel nos études ont été effectuées, cette thèse présentera six chapitres distincts en débutant par **l'introduction au chapitre 1** qui comprendra une section exposant des publications réalisées écrits qui vise à présenter les différentes recherches réalisées sur le sujet et sur lesquelles nous appuierons et développerons cette thèse. Nous en profiterons pour définir les concepts de contrôle de la balance énergétique des facteurs pouvant la modifier et ses conséquences sur l'organisme en cas de dérèglement des signaux centraux. Nous terminerons ce chapitre sur l'état des connaissances sur les AGPI, notamment les N-3 et sur les récepteurs liés à la protéine G et en particulier, le GPR120.

Le Chapitre 2 présente la **méthodologie** générale des protocoles de recherche mis en place et le mode de traitement des données.

Le Chapitre 3 comprend un article intitulé « **Perinatal deficiency in omega-3 fatty acids potentiates adiposity and suppresses locomotor activity on a high-fat diet** ».

Le Chapitre 4 s'intitule « **Central agonism of GPR120 acutely inhibits food intake and food reward and chronically suppresses anxiety-like behavior in mice** ».

Le Chapitre 5 comporte une **discussion générale** et le Chapitre 6 une **conclusion générale et des perspectives**. Ce dernier chapitre nous permet d'évaluer l'impact des différents résultats obtenus lors de notre recherche avec la présentation d'un éventail plus

large d'études déjà publiées. Il inclue à la fois une synthèse et une analyse critique des résultats observés en plus de souligner les forces et les lacunes méthodologiques des deux études ainsi que des pistes de recherches à étudier dans le futur.



## **Chapitre 1 : Contexte théorique**

Ce chapitre introduit les concepts nutritionnels de base du contrôle de la balance énergétique qui se manifestent par les signaux homéostatiques et hédoniques. Il débutera par la présentation des différents facteurs qui régulent la balance énergétique et la programmation fœtale puisque cette dernière joue un rôle primordial dans l'apparition du syndrome métabolique qui est liée à des altérations pouvant modifier le circuit de récompense. On ne peut passer sous silence le concept « programmation métabolique », puisqu'il semblerait que l'apport ou l'absence de certains nutriments n'a pas le même effet selon le stade de développement, puisque cette dite programmation ouvre la porte à la notion de « période critique ». Connaissant le rôle que jouent les AGPI sur la santé, nous allons nous attarder sur les AG  $\omega$ -3 et un récepteur cible pour les AGPI, le GPR120.

## **1.1. Description de la balance énergétique**

Afin de maintenir son poids corporel, tous les mammifères doivent se procurer quotidiennement une quantité d'énergie égale à celle qu'ils dépensent afin d'établir un équilibre entre les apports et les dépenses d'énergie. La Figure 1 illustre la balance énergétique avec ces deux composantes contribuant à son équilibre. Dans les conditions où les apports sont inférieurs aux dépenses « Apports < Dépenses » (Figure 1A), on a un dérèglement en faveur des dépenses conduisant à une perte de poids. À l'inverse, lorsque les apports sont supérieurs aux dépenses « Apports > Dépenses » (Figure 1B), on assiste à un dérèglement en faveur des apports. Il en résulte un gain de poids. Lorsque les apports sont en quantité égale aux dépenses « Apports = Dépenses » (Figure 1C), on dit que la balance énergétique est atteinte et qu'il y a une stabilité du poids.

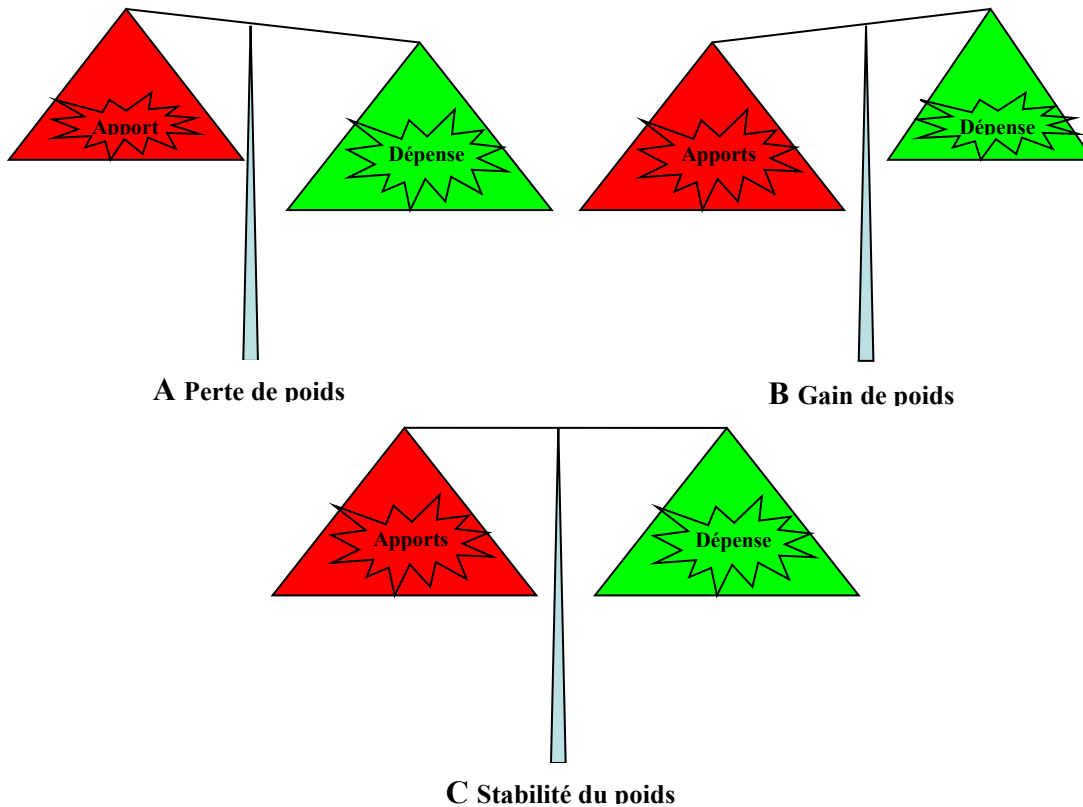


Figure 1: Illustration de la balance énergétique.

Triangle en rouge représente les apports et triangle en vert les dépenses.

❖ Les apports font références surtout à la consommation et à l'absorption alimentaire pouvant varier en fonction des goûts personnels et de l'état émotionnel et psychologique de l'individu. Certaines personnes anticipent un plaisir ou un réconfort devant un repas alors que d'autres ont une aversion envers la nourriture.

❖ Les dépenses énergétiques des 24 heures sont représentées par la somme de trois grandes étapes : le métabolisme de base ou la dépense énergétique au repos, la thermogénèse d'adaptation et l'énergie dépensée pour l'activité physique.

-Le métabolisme de repos ou métabolisme de base (MB) correspond à la dépense énergétique minimale du maintien du poids et à l'entretien vital représentant

approximativement 60-70 % des dépenses énergétiques quotidiennes d'un individu sédentaire sain [79].

-La thermogenèse d'adaptation est le phénomène selon lequel de la chaleur est produite par la dissipation d'énergie dans un environnement à température neutre. Elle comprend la thermogenèse d'alimentation et la thermogenèse postprandiale [80]. Cette dépense énergétique représente environ 10 % à 14 % de la quantité totale d'énergie ingérée pendant 24 heures chez les sujets sains ayant un régime mixte [80]. Une mauvaise efficacité de la thermogenèse postprandiale peut être à l'origine du développement de l'obésité chez le rat et dans une moindre mesure chez l'homme [81].

-L'activité physique est une composante des dépenses énergétiques en fonction de la durée (temps passé durant une séance), de l'intensité (effort physiologique associé à une activité particulière) et de la fréquence (nombres de séances pendant une période spécifique déterminée) de celle-ci [82]. Elle ne représente que 20 à 30 % de la dépense énergétique totale chez des individus sédentaires [79] et peut atteindre jusqu'à 60 % de la dépense énergétique totale lors d'efforts prolongés [82]. Il est à noter que l'activité physique intervient à la fois au niveau du contrôle homéostatique et du contrôle hédonique. Dans le contexte homéostatique on se réfère aux activités journalières d'un sédentaire tandis que dans le contexte hédonique on se réfère à la motivation, à la sensation et au bien-être (activité physique motivationnelle).

## **1.2 Contrôle central de la balance énergétique**

La recension des écrits faisant état de la prise alimentaire fait souvent référence à deux termes « régulation » et « contrôle » de la balance énergétique. Habituellement le terme

régulation désigne la capacité dont possède un système avec une boucle de rétroaction négative pour minimiser les effets pouvant être produits sur une variable donnée. Le terme contrôle est utilisé lorsque la valeur d'une variable « y » est déterminée uniquement par la variable indépendant « x » suggérant que « y » est sous la dépendance de « x » [83]. Lorsque les auteurs se réfèrent au « contrôle de la prise alimentaire » ou à la « régulation de la prise alimentaire », ils se réfèrent généralement au même processus physiologique. La différence est principalement attribuable à une question de sémantique [84, 85]. Un tel phénomène physiologique dépend d'un réseau de signalisation complexe incluant à la fois des signaux hormonaux et métaboliques contenant les nutriments et des signaux nerveux efférents du système nerveux autonome et provenant à la fois de l'hypothalamus et du tronc cérébral [86]. Ce contrôle de la balance énergétique nécessite donc la régulation par deux processus différents soit l'homéostatique et le non homéostatique ou l'hédonique. Le cerveau est divisé en deux hémisphères et la surface externe de chaque hémisphère, le cortex cérébral, est réparti en cinq lobes principaux : frontal, pariétal, temporal, insulaire et occipital.

### **1.2.1 Contrôle homéostatique**

Le terme « **homéostasie** » a été proposé pour la première fois en 1932 par le physiologiste W.B. Cannon dans son ouvrage « la sagesse du corps, 1932 » en voulant définir « l'équilibre physiologique » [87]. Pour certains auteurs ce terme a été inventé afin de décrire les aspects métaboliques et non cognitifs de la régulation du bilan énergétique [88]. Elle permet de conserver la stabilité et l'équilibre de l'environnement interne [89] dans le contrôle de la prise alimentaire qui en réalité est sous le contrôle du système nerveux central.

## ❖ L'hypothalamus

La Figure 2 montre l'emplacement de l'hypothalamus dans le système nerveux central à la base du cerveau, au-dessus du tronc cérébral, entre le thalamus et la glande pituitaire.

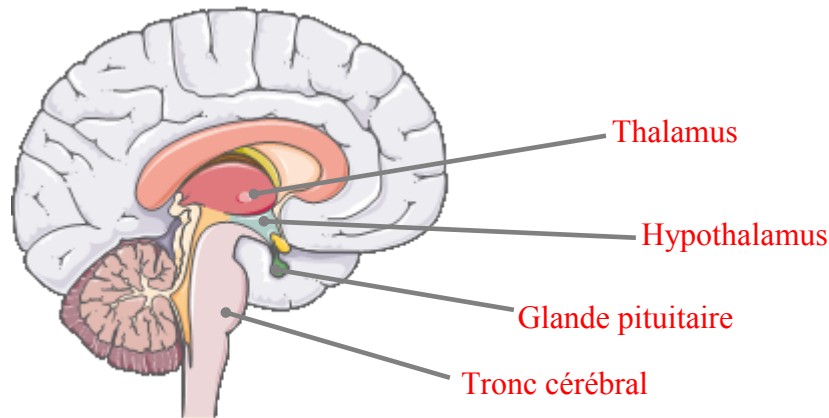


Figure 2 : Localisation de l'hypothalamus dans l'encéphale.

[Illustration fait grâce à Servier Medical Art]

Les principaux centres de régulation siégeant au niveau des différents noyaux hypothalamiques [90-92] établissent des connexions afférentes et efférentes avec de multiples autres régions cérébrales et du tronc cérébral [93, 94]. Des études menées dans les années 1940 chez le rat, le chat ainsi que le singe ont démontré que des lésions ou des stimulations électriques de l'hypothalamus ventromédian conduisaient au développement de l'hyperphagie chronique et de l'obésité. Toutefois, cette lésion de la région latérale entraînait une diminution de la prise alimentaire et une perte de poids [95, 96]. C'est ainsi que furent créés les concepts de « **centre de la satiété** », correspondant au noyau hypothalamique ventromédian (VMN) et de « **centre de la faim** », désignant la région hypothalamique latérale (LH). Ce contrôle de l'homéostasie énergétique ou de la balance énergétique est non seulement dépendant de l'hypothalamus mais également d'une autre structure cérébrale qu'est le tronc cérébral.

### ❖ **Le tronc cérébral**

Il représente le premier relais central des informations du système nerveux périphérique puisqu'il reçoit et intègre les signaux du tractus digestif et de l'état énergétique de l'organisme à partir des nerfs afférents du vague et des voies humoro-hormonales pour les transmettre à l'hypothalamus en assurant ainsi l'adaptation exacte aux besoins de consommation [84].

### **1.2.2 Contrôle hédonique**

La consommation alimentaire de l'homme est non seulement motivée par le besoin de se nourrir mais aussi pour son plaisir. Ce phénomène appelé « **l'hédonie** » consiste à consommer un aliment pour son goût agréable (palatabilité) et le plaisir qu'il procure. Plusieurs activations cérébrales associées à ce phénomène semblent aussi être associées à diverses notions comme la motivation ou la récompense [97]. Ces 2 facteurs sont liés à la palatabilité de l'aliment, c'est-à-dire à la composante affective alimentaire, aux propriétés organoleptiques intrinsèques des aliments mais également à la préférence individuelle et à l'état énergétique d'un aliment. D'une manière générale, plus la palatabilité de l'aliment augmente et plus la prise alimentaire devient importante [98, 99].

Dans la Figure 3, Berthoud illustre les différentes connections entre le système cognitif et le système métabolique lors du contrôle de la prise alimentaire. En général on peut comparer le système cognitif et le système métabolique aux processus hédoniques et métaboliques puisqu'il s'agit en réalité de la même définition.

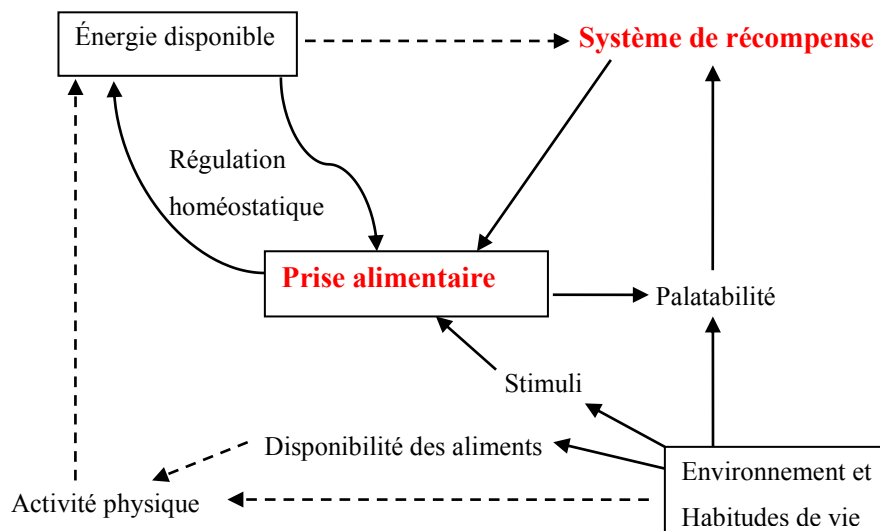


Figure 3: Principaux facteurs impliqués dans la prise alimentaire.

Figure traduite et adaptée à la référence suivante : Berthoud HR. Interactions between the "cognitive" and "metabolic" brain in the control of food intake [100]. Les lignes continues indiquent les effets stimulants ou accrus alors que les lignes pointillées indiquent les effets négatifs ou diminués. Le système de récompense inclut la valeur hédonique attribuée aux aliments et la motivation à manger.

Cette figure nous illustre comment la prise alimentaire peut être influencée non seulement par l'énergie disponible dans l'organisme mais aussi par l'environnement et les habitudes de vie et par le système de récompense. En termes d'énergie disponible, le tissu adipeux est l'unité de réserve principalement impliqué dans le maintien de l'homéostasie énergétique puisqu'il est la principale source de la leptine. Cette hormone, comme nous la verrons plus loin, joue un rôle capital dans la régulation homéostatique de la prise alimentaire. En effet à la suite d'une prise alimentaire, les signaux de satiété envoient des influx nerveux au cerveau lui commandant de réguler la quantité d'aliments ingérés en agissant par l'intermédiaire des récepteurs centripètes du nerf vague ou des récepteurs du tronc cérébral.



Pendant que les signaux de satiété transmettent des informations au cerveau, la leptine et l'insuline représentées par des signaux d'adiposité (énergie disponible), renseignent le cerveau sur la quantité des réserves de l'organisme. De plus, malgré ces réserves et même lorsque les besoins énergétiques sont comblés et ont atteint un état de satiétogène, un indice de l'environnement peut amener à une augmentation de la prise de nourriture palatable dite « réconfortante » [101, 102] par une stimulation sensorielle (odorat, goût, vision) venant activer le système de récompense [103]. Il existe ainsi une boucle de régulation de la prise alimentaire entre le système nerveux central et la périphérie qui s'effectue à court, à moyen et à long terme.

#### ❖ **Le circuit de récompense ou de motivation**

Le « **système de récompense** » joue un rôle central dans nos choix alimentaires puisque son rôle est de procurer une sensation temporaire de bien-être en nous orientant prioritairement vers des aliments nous procurant une source de plaisir malgré que ceux-ci puissent pour la plupart être obésogènes. Lors de l'ingestion de nourriture régulière, les influx nerveux parviennent au tronc cérébral renseignant au cerveau sur le goût et le contenu énergétique de l'aliment consommé. Toutefois, lors de la consommation de nourriture palatable, ayant un goût plus prononcé qu'une diète régulière, les influx nerveux sont transmis au centre de récompense, celui-ci étant composé des différentes structures du système limbique et du noyau accumbens (NAc). Ce processus entraîne la libération de médiateurs de récompense, la dopamine, la sérotonine, les endocannabinoïdes et les opioïdes [104, 105]. Quel que soit le plaisir ressenti, il est associé à l'activation du système hédonique souvent appelé système de récompense chez l'animal [106]. Ce système comprend la voie

dopaminergique mésocorticolimbique qui s'étend du tronc cérébral au cortex frontal et au noyau accumbens. Il est à noter que le système limbique et ses connexions sous-tendent les mécanismes émotionnels se rapportant soit aux motivations alimentaires (attirance, appétit), soit aux instincts de conservation en cas de danger (combattre ou fuir, c'est-à-dire agressivité ou répulsion) ou encore, à la mémoire des expériences [107].

Ce terme « récompense » a suscité de nombreuses controverses dans la littérature scientifique portant sur les travaux effectués chez les animaux. Il suggère que le système de récompense puisse parfois être confondu avec le terme « liking » ou « aimer » qui se réfère au plaisir ressenti au cours de la consommation d'un aliment délicieux et le « wanting » ou « vouloir » qui désigne l'intérêt de l'animal vers un stimulus soit, un comportement d'attraction vers le stimulus [108, 109]. Les verbes « Aimer » et « vouloir » doivent être utilisés ensemble afin que la récompense soit entière. Les deux se produisent généralement ensemble chez les humains [97]. Un fonctionnement anormal des mécanismes de récompense alimentaire peut mener à une forte attirance pour un ou plusieurs aliments [97] pouvant nous guider à vouloir obtenir encore plus le plaisir hédonique fournit par cet aliment palatable. Cet intérêt pour les aliments peut également être attribuable aux drogues d'abus. Au cours de cette décennie, la neuropsychopharmacologie a examiné le fondement biologique des drogues de comportement et a développé un modèle pour tenter d'expliquer pourquoi la prise de certains médicaments est si attrayante. Selon leur hypothèse, les drogues sont recherchées parce qu'elles activent directement le système de récompense du cerveau et plus particulièrement au sein du réseau neuronal responsable de l'expérience subjective du plaisir. Le fondement de cette hypothèse a vu le jour en 1958 lorsque les chercheurs Olds et Milner [110] ont observé que les animaux seraient disposés à fournir plus d'effort pour la stimulation électrique quasi permanente de

certaines voies neuroanatomiques dans le cerveau, en particulier le système limbique et ceci, aux dépens des fonctions vitales telle que la réaction face à la faim ou la soif.

Le modèle animal n'est pas in extenso extrapolable à l'homme puisque les mécanismes biochimiques ne peuvent à eux seuls définir l'addiction chez l'homme. Il faut non seulement tenir compte des aspects affectifs et psychologiques mais également relationnels et sociaux qui interfèrent avec le comportement et les choix alimentaires pouvant eux-mêmes modifier la balance énergétique.

### **1.3. Signaux qui modifient la balance énergétique**

De multiples signaux peuvent avoir une incidence importante sur le comportement alimentaire en renforçant ou au contraire en antagonisant les signaux liés au statut énergétique. Il peut donc s'agir de signaux externes, internes, émotionnels étant liés aux dépenses énergétiques et pouvant influencer la balance énergétique en contribuant à la progression de l'obésité et des maladies chroniques associées [33, 111].

Par exemple, des modifications du statut nutritionnel et hormonal en début de vie et la sédentarité [112] de même que des facteurs externes influençant notre mode de vie qu'ils soient économiques, culturels, génétiques ou environnementaux [113, 114] peuvent tous influencer notre consommation alimentaire. Il a également été démontré que les aberrations chromosomiques, les troubles hormonaux, les drogues, les lésions hypothalamiques ou tumorales [115-117] peuvent modifier l'homéostasie énergétique. Nous porterons une attention particulière aux signaux hormonaux tant périphériques que centraux pouvant modifier cette balance énergétique.

### 1.3.1. Signaux hormonaux périphériques

Notre compréhension de la régulation de l'appétit et de la balance énergétique a progressé au cours de la dernière décennie nous permettant de comprendre comment des signaux internes pouvaient influencer l'homéostasie énergétique. Les peptides et hormones de la périphérie sont pour la plupart sécrétés par le tube digestif, le pancréas ou par le tissu adipeux comme la leptine [118, 119]. Ces substances agissent au niveau du système nerveux central qui en retour contrôle la prise alimentaire, la dépense énergétique et les métabolismes périphériques. Fulton (2010) a décrit dans une illustration de la Figure 4, comment certains signaux périphériques peuvent agir sur le circuit neuro-dopaminergique et influencer les effets de récompense de la nourriture [36].

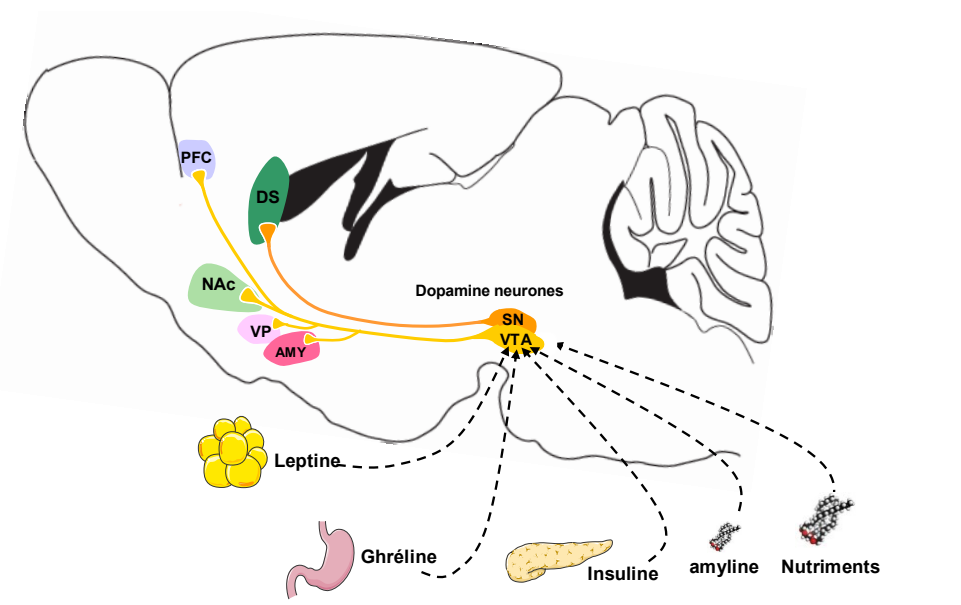


Figure 4 : Détection des signaux métaboliques par le circuit neuronal dopaminergique.

Image modifiée de Fulton, 2010 [36].

PFC : Prefrontal cortex ; VP : Ventrum pallidum ; DS : Dorsal striatum ; AMY : Amygdala ; SN : Substantia nigra ; NAc : Nucleus accumbens ; VTA : Ventrum tegmental area

Cette figure montre la voie de signalisation neuronale de certaines substances et hormones dans différentes aires spécifiques du cerveau. Ces signaux agissent principalement sur les noyaux hypothalamiques du cerveau qui exercent une influence sur l'apport alimentaire [120].

**La leptine** est une protéine synthétisée dans le tissu adipeux [121] qui se combine à la longue-forme de son récepteur (LepRb) afin d'informer le cerveau sur le statut énergétique de l'organisme en périphérie [122]. Elle est fortement corrélée avec la masse grasse corporelle et peut varier considérablement selon les individus [123, 124]. Elle se lie à ses récepteurs au niveau des neurones à neuropeptide Y (NPY), des neurones favorisant la consommation d'aliments [125].

**La ghréline** est une hormone produite et sécrétée dans la circulation sanguine par les cellules endocrines de l'estomac [126] qui agit sur le cerveau pour indiquer au corps son besoin de manger afin de maintenir un poids corporel. Elle agit directement sur le tronc cérébral et l'hypothalamus en activant les neurones NPY [127] et également sur le système de récompense de l'aire tegmentale ventrale (VTA) afin d'augmenter la libération de la dopamine ayant un effet oréxigène en favorisant la prise alimentaire et la consommation d'aliments savoureux [127]. Il est à noter que la leptine procure des renseignements sur les besoins énergétiques sur le long terme par des signaux toniques alors que la ghréline renseigne sur des données à court terme par des signaux épisodiques générés lors de la prise alimentaire [128].

**L'insuline** est une protéine synthétisée au niveau des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans dans le pancréas, réduisant la prise alimentaire en agissant sur ses récepteurs au cerveau alors qu'elle a une action anabolique en périphérie [129]. Elle agit sur les transporteurs du glucose, lui permettant de traverser la barrière hématoencéphalique (BHE) et d'entrer dans les cellules

[130]. L'injection centrale d'insuline réduit la prise alimentaire et augmente la dépense énergétique [130] tout en diminuant l'expression du NPY et en augmentant l'expression de la pro-opiomélanocortine (POMC) [131]. Ainsi, lorsque l'insuline augmente dans le sang après un repas, elle augmente aussi de façon proportionnelle dans le cerveau [132].

**L'amyline** est une hormone pancréatique cosécétrée avec l'insuline par les cellules bêta après un repas et qui participe à la régulation du glucose avec l'insuline en ralentissant la vitesse de vidange gastrique [133]. Outre son rôle sur la vidange gastrique, l'amyline pourrait également inhiber la prise alimentaire, l'activité d'enzymes du tractus digestif et la sécrétion de glucagon [134]. L'amyline périphérique est capable de traverser la barrière hématoencéphalique [135] et jouer un rôle opposé à la ghréline, dans l'inhibition de la prise alimentaire [136].

### **1.3.2. Signaux hormonaux centraux**

Plusieurs signaux de nature nerveuse ou hormonale sont intégrés au niveau du SNC afin de réguler les dépenses et les apports énergétiques. Ces derniers font appel à de nombreux messagers; neuromédiateurs, neuropeptides, peptides digestifs, neuromessagers (catécholamines) et hormones (cortisol, insuline, leptine, ghréline, hormones sexuelles) qui permettent l'établissement d'une réponse métabolique et comportementale adaptée. Afin d'en simplifier la lecture, nous avons regroupés ces signaux en 4 catégories : les neuropeptides, les neurotransmetteurs, les opioïdes et les endocannabinoïdes.

### 1.3.2.1. Neuropeptides

Le noyau arqué (ARC) de l'hypothalamus est reconnu pour intégrer la multiplicité des signaux qui sont, soit d'origine peptidique ou non peptidique, à effets oréxigénique ou anorexigénique et pour réguler l'appétit [137].

❖ **Les orexigènes** synthétisent des neurotransmetteurs qui stimulent la faim. Parmi ceux-ci nous pouvons citer le neuropeptide Y (NPY), l'agouti-gene related peptide (AGRP), le melanin concentrating hormone (MCH).

❖ **Les anorexigènes** synthétisent des neurotransmetteurs qui inhibent la faim. Ce sont la  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH); les hormones gastro-intestinales : les glucagon-like peptides (GLPs), le peptide YY (PYY), la cholécystokinine (CCK), la pro-opiomélanocortine (POMC), la leptine et l'insuline.

❖ **Les opioïdes** ont leurs récepteurs qui se localisent dans les régions hypothalamiques impliquées lors du contrôle de la prise alimentaire et dans le noyau accumbens (NAc) [138]. Ils stimulent la prise alimentaire en intensifiant la sensation de faim [139] mais c'est avant tout la palatabilité de la nourriture plutôt que son contenu énergétique qui active le système opioïde [140]. À l'inverse, l'administration d'antagonistes des opiacés diminue l'attraction de la nourriture sans affecter le goût en ne venant pas activer le système de récompense [141, 142].

### 1.3.2.2. Neurotransmetteurs

❖ **La dopamine** (DA) est le principal neuromédiateur de la composante motivationnelle qui semble impliquer dans le système de récompense et dans les processus de

modulation du comportement alimentaire [143, 144]. Une inhibition des récepteurs de la DA au niveau de l'hypothalamus stimule la prise alimentaire [145] alors qu'une stimulation des ces récepteurs au niveau périfornical de l'hypothalamus est associée à une suppression de la prise alimentaire [146, 147].

❖ **La sérotonine** est synthétisée à partir du tryptophane jouant un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire [148] et en diminuant la sensation de faim [149]. La sérotonine est également importante pour alléger l'état de stress chez des animaux placés sous diète riche en gras et qui expriment un comportement de type anxieux [150].

❖ **Endocannabinoïdes (eCB)**. Ce système est connu pour promouvoir la consommation alimentaire au niveau central en agissant à la fois sur le système mésolimbique et sur le système hypothalamique [151, 152]. Les endocannabinoïdes (eCB) sont des dérivés d'acides gras polyinsaturés à longues chaînes (AGPI-LC) qui se retrouvent dans le cerveau et particulièrement l'AA [153] qui possèdent un effet oréxigène [152]. Ils ont été impliqués dans les processus de neuroprotection et modulent le relargage des neurotransmetteurs comme la dopamine [154].

Les mécanismes impliqués dans la détection et l'intégration de signaux métaboliques et hormonaux au niveau du SNC sont très finement contrôlés. Cette activation centrale de ce système complexe, où tous les signaux sont entrelacés, agit de manière différente dépendamment de la zone stimulée, du mode d'administration, de l'état de jeûne ou de satiété et du type de populations neuronales spécifiques activé ou inhibé pour maintenir l'homéostasie.



### 1.3.3. Nutriments

Certains nutriments tels que les glucides, les protéines, les lipides, particulièrement les acides gras libres (AGL) peuvent également traverser la BHE grâce à sa perméabilité et atteindre l'hypothalamus. Les entrées d'énergie résultent de la quantité relative d'aliments consommés provenant des 3 catégories de macronutriments qui diffèrent par leur densité énergétique: glucides (4 Kcal/g), lipides (9 Kcal/g) et protéines (4 Kcal/g) et qui sont digérés puis transformés en nutriments plus simples (glucose, acides gras, acides aminés) pour ensuite pénétrer dans les cellules et être utilisés comme métabolites énergétiques. Dans le paragraphe qui suit, nous allons détailler les différents nutriments et démontrer leurs effets en tant que signaux nutritionnels

#### 1.3.3.1. Les glucides

Du mot latin « *glucis* » qui signifie « doux », les glucides sont la principale source d'énergie nécessaire au fonctionnement du cerveau et du système nerveux. La détection du glucose est davantage étudié et mieux documenté dans l'hypothalamus [155]. Mayer en 1953 [156] puis Louis-Sylvestre et Le Magnen en 1980 [157] ont observé que chacune des prises alimentaires était précédée d'une légère hypoglycémie. Ils ont ainsi stipulé par **La théorie glucostatique** que l'utilisation du glucose dans l'hypothalamus produit la sensation de satiété. De même que les organes et/ou tissus spécialisés peuvent détecter les variations de la glycémie par le mécanisme de « glucose sensing », le tissu cérébral possède ses récepteurs « glucose sensors » pouvant répondre aux fluctuations de la glycémie pour moduler la prise alimentaire. Cette détection de l'hypoglycémie par le SNC induit des réponses périphériques par la sécrétion de glucagon, des catécholamines ou hormones de croissance, de la stimulation de la

production hépatique de glucose et de l'inhibition de la sécrétion d'insuline par un mécanisme de « réponses de la contre régulation » [158, 159].

### **1.3.3.2. Les protéines**

Du mot grec « *protos* » qui signifie « premier » ou « de première importance », les protéines servent aux fonctions essentielles de la matière vivante puisqu'elles sont des constituants fondamentaux des cellules vivantes. Elles sont composées d'une vingtaine d'acides aminés dont 8 sont dits « essentiels ». Elles peuvent être utilisées en tant que source d'énergie et produire un effet satiétogène [160] lorsque l'apport alimentaire en glucides et en lipides est insuffisant. Grâce à ces deux grandes théories, glucostatique et lipostatique, des chercheurs ont émis d'autres hypothèses conduisant à la ***théorie aminostatique*** de Mellinkoff [161] stipulant que la présence de nourriture dans le tube digestif entraîne la libération d'un ou de plusieurs polypeptides qui agissent sur l'hypothalamus pour inhiber la prise alimentaire en agissant sur la satiété post prandiale. En d'autres termes, l'augmentation des concentrations plasmatiques circulantes des acides aminés par l'apport alimentaire riches en protéines régule la prise alimentaire [162].

### **1.3.3.3. Les lipides**

Du mot grec « *lipos* » qui signifie « graisse ». Mis à part la théorie glucostatique, d'autres théories ont été énoncées pour tenter d'expliquer la complexité de la prise alimentaire. Parmi celles-ci on peut citer la ***théorie lipostatique*** de Kennedy [163] stipulant qu'une augmentation de la masse adipeuse (tissu adipeux) induit une sécrétion adipocytaire de signaux anorexigènes (proportionnelle à la quantité de graisse) détectés par le SNC

(l'hypothalamus) et entraînant en retour une diminution de la prise alimentaire, une perte de poids ainsi qu'une augmentation de la dépense énergétique. En plus de leur haute densité énergétique, les lipides sont très agréables au goût puisqu'ils renforcent les arômes, stimulent la sécrétion de la leptine exerçant ainsi un effet inhibiteur sur la prise alimentaire dans le long terme [84]. Les AGL en général sont reconnus non seulement comme étant des nutriments essentiels mais ils jouent également un rôle important en tant que molécules de signalisation [164] et de régulation de l'expression des gènes modulant le métabolisme et l'inflammation [165] en participant à l'assimilation de molécules liposolubles importantes comme les vitamines A, D, E et K [166]. Parmi ces AGL, il a été énoncé que l'accroissement rapide d'ADH se produit au cours du développement prénatal chez les humains et les rats [167]. Le déficit de celui-ci et de l'AEP de la diète maternelle pendant la gestation, l'allaitement et l'alimentation de l'enfant augmente le risque du comportement de type anxieux à l'âge adulte en raison de l'implication potentielle des mécanismes moléculaires [168]. Nous détaillerons les lipides dans la section 1.4 réservée aux acides gras polyinsaturés.

#### **1.3.4. Signaux liés aux facteurs émotionnels**

Les émotions sont des réactions physiologiques, cognitives, comportementales et typiques à l'humain. Ces processus font intervenir des facteurs psychoaffectifs tels que l'humeur, l'anxiété, le stress psychologique, la dépression et ils ont tous une grande influence sur le comportement alimentaire. Toutefois, il existe un lien important entre les facteurs alimentaires et la santé mentale [169-171]. Parmi ces troubles psychologiques, nous nous sommes intéressées plus particulièrement à l'anxiété et à la dépression.

### **1.3.4.1. L'anxiété**

Dérivé du latin *anxietas*, l'anxiété est cliniquement définie comme un sentiment pénible d'attente, une peur sans objet et la crainte d'un danger imprécis [172]. Lorsque l'anxiété induite est transitoire, elle entraîne une activation du SNC et se caractérise par une réponse adaptative face aux dangers permettant de fuir la source du danger ou encore de la combattre. Par contre si l'anxiété induite est prolongée, ce comportement devient mal adapté et pathologique pouvant ainsi hypothéquer le bon fonctionnement de l'individu. C'est un concept-clé en psychologie, clairement discuté dans une revue scientifique mettant l'accent sur les aspects physiologiques, biologiques, psychosociaux et médicaux de sports de compétition chez les jeunes [173]. Outre dans cet article, l'anxiété a été identifiée comme étant à la base de nombreuses maladies et autres désordres mentaux [174]. La prévalence des troubles anxieux en général au cours de la vie représente 6 à 29 % des troubles mentaux [175, 176]. Ils sont associés à une comorbidité et sont extrêmement invalidants [177]. Au Canada, environ 14 milliards de dollars par année sont alloués à la prise en charge des troubles anxieux [178]. La multitude de publications sur l'anxiété tant chez les humains que chez les animaux a permis d'approfondir notre compréhension sur ce phénomène et de mieux cerner ce concept vu la complexité qu'il provoque chez les scientifiques. Il est particulièrement difficile de définir l'anxiété alors on peut comprendre que de la mesurer demeure une tâche aussi complexe. Toutefois, mesurer l'anxiété comporte plusieurs intérêts. Il existe des expériences spécifiques couramment utilisées pouvant évaluer l'anxiété chez l'homme et chez l'animal.

## - Chez l'homme

La mesure de conductance de la peau « Galvanic Skin Response » fut l'un des outils physiométriques utilisés afin d'évaluer l'anxiété en état d'éveil et l'activité du système nerveux autonome. La mesure des pulsations cardiaques fut également une mesure d'anxiété couramment employée en laboratoire. Bien que ces réactions physiologiques soient généralement considérées comme une caractéristique importante de l'anxiété, les tentatives afin de démontrer une concordance entre cette mesure physiologique de conductance de la peau et celles des pulsations cardiaques associée au même test d'anxiété ont toutefois échouées [179]. Puisque les réactions physiologiques de l'anxiété ne dépendent pas uniquement de l'intensité de l'éveil du système nerveux autonome mais également d'autres facteurs en dehors de la situation à laquelle le sujet est soumis, Spielberger a proposé qu'il fallait déterminer les « évaluations cognitives » des individus par rapport à leur perception d'un point de vue environnemental [180]. C'est ainsi que la facilité d'administration d'un questionnaire et le résultat en deux volets de l'anxiété (**du trait** : correspond à une caractéristique générale, stable, de la personnalité du sujet sans rapport avec une situation spécifique et **de l'état** : est suscitée ponctuellement en réponse à un contexte ou à une situation donnée) furent des caractéristiques favorisées dans tous les milieux pour réaliser le test d'anxiété [181]. Dans sa version française, traduite par Bergeron, Landry et Bélanger [174] de l'Université de Montréal, ce test fut nommé « le test d'Anxiété Situationnelle et de Trait d'Anxiété » (ASTA). Certains auteurs considère l'anxiété de l'état comme une **anxiété « normale »** et non pathologique [182]. Elle pourrait être assimilée au stress puisqu'elle permet à l'organisme d'être alerté et en éveil afin de s'adapter face à une modification brutale et inhabituelle de l'environnement.

D'autres considèrent toutefois l'anxiété du trait à une **anxiété « pathologique »** comme étant un état chronique résultant de l'impossibilité pour l'organisme de réguler la stabilité du milieu interne face à une situation anxiogène [183]. L'anxiété pathologique peut aussi être considérée comme un excès d'anxiété « normale » [184, 185]. Les AG N-3 sont bénéfiques pour la santé, la plupart ayant récemment amélioré l'humeur et diminué l'anxiété [186]. Des études plus approfondies ont démontré que la chair des poissons contenait une huile riche en N-3 et qu'elle diminuait significativement l'anxiété [187]. Buydens-Branchey et al. dans une étude menée auprès des toxicomanes ont révélé qu'une supplémentation de 3 mois en AEP et en ADH entraîne une diminution significative de la colère et de l'anxiété [50].

Même lorsque les analogies entre l'homme et le rongeur sont souvent difficiles à établir, des études ont permis d'identifier non seulement des réseaux neuronaux mais aussi des tests comportementaux impliqués dans le traitement de l'anxiété chez les animaux.

### **- Chez le rongeur**

Chez l'animal et puisque la composante subjective des émotions n'est pas accessible, il est admis que leur expression comportementale et les processus neurobiologiques qui les accompagnent sont largement suffisants pour évaluer l'anxiété [188]. Ainsi, les paramètres physiologiques (pression artérielle, rythme cardiaque) et comportementaux (évitement, fuite ou immobilité) qui témoignent de l'état anxieux chez l'animal (anxiété d'état), sont sensibles aux anxiolytiques efficaces chez l'homme [189]. La littérature scientifique rapporte 2 types de tests utilisés pour évaluer l'état anxieux chez les rongeurs. Ce sont des expériences établies sur des aversions naturelles (tests non conditionnés) et sur des aversions apprises (tests

conditionnés). Les tests non conditionnés sont basés sur la réaction spontanée, soit innée de l'animal face à une situation anxiogène alors que les tests conditionnés nécessitent une phase de conditionnement durant laquelle un stimulus neutre (signal lumineux) ou récompensant (nourriture palatable ou drogue) est associé ou non à un stimulus aversif (choc électrique par exemple). Le Tableau 1 résume les principales expériences conditionnés et inconditionnés utilisés chez les rongeurs afin d'évaluer un état anxieux ainsi que les différents modèles d'anxiété créés soit par manipulations génétiques, environnementales, nutritionnelles ou pharmacologiques afin de produire un état d'anxiété pathologique (anxiété de trait ou modèles de troubles anxieux).

Tableau 1 : Représentation des différents tests et modèles d’anxiété développés chez les rongeurs.

Modifiée d’après la revue de Sartori et al. [190].

<b>Tests d’évaluation de l’état anxieux aigu (anxiété d’état).</b>	<b>Modèles d’anxiété chronique exagérée (anxiété de trait).</b>
<b>Tests non conditionnés</b> ✦ Tests basés sur le conflit approche-évitement: – Open-field – Labyrinthe en croix surélevé ✦ Tests sociaux: – Interactions sociales – Compétitions sociales ✦ Autres: – Marble burying	<b>Anxiété innée</b> ✦ Différences de souches ✦ Modèles génétiques
	<b>Manipulations environnementales</b> ✦ Élevage en conditions défavorables – Séparation maternelle – Sevrage précoce ✦ Exposition chronique au stress – Stress chronique léger – Stress chronique social
<b>Tests conditionnés</b> ✦ Tests basés sur le conflit: – Test d’aversion de place conditionnée ✦ Autres: – Peur conditionnée – Enfouissement défensif	<b>Modèles nutritionnels</b> ✦ Déficience en magnésium
	<b>Modèles pharmacologiques</b> ✦ Sevrage à une drogue
	<b>État d’anxiété aigu</b> ✦ Modèle pharmacologique

Ces tests sont prédictifs d’un phénotype et d’une activité anxiolytique chez l’animal. Dans nos études nous avons utilisé *l’Open-field* et le labyrinthe en croix surélevé. Ce sont des tests d’évaluation de l’état anxieux et non conditionnés établis sur le conflit approche-évitement.

Comme chez les humains, les AG N-3 ont démontré leurs bienfaits sur l’état d’anxiété de jeunes primates (non-humains), les Microcèbes (*Microcebus murinus*). Les effets de 12 mois d’une supplémentation en AG N-3 ont été évalués sur les performances cognitives et



d'anxiété [191]. Plus de la moitié des gens qui souffrent d'un trouble anxieux en tant que diagnostic primaire souffrent également de symptômes dépressifs [22]

### **1.3.4.2. La dépression**

La dépression est un trouble psychique qui se caractérise par la tristesse passagère jusqu'à la dépression profonde [192] en passant par différents symptômes tels que des sentiments de désespoir, d'impuissance, d'inutilité et une incapacité à éprouver du plaisir. Elle provoque des difficultés cognitives comme des problèmes de concentration, des changements comportementaux tels que des modifications du comportement alimentaire (perte de goût, d'appétit) et sexuel (absence de libido), des ralentissements de l'activité psychomotrice, et des manifestations physiques regroupant par exemple des perturbations du sommeil et la perte de poids [193].

Le développement des modèles animaux est nécessaire pour saisir divers aspects de la pathologie humaine, comme des changements physiologiques ou comportementaux mais aussi pour mieux comprendre la dynamique des effets thérapeutiques. Certains critères ont été proposés afin d'établir le bon modèle animal de pathologie [194] parmi lesquels on distingue des modèles fondés sur le stress, les interactions sociales et d'injections chroniques de corticostérone. Idéalement afin d'établir un modèle animal de pathologie humaine il faudrait avoir comme fondement des causes et des symptômes identiques répondant aux mêmes traitements en tenant compte des comorbidités décrites en clinique. Il a été démontré qu'il existe un lien entre le stress et la dépression [195]. Ceci s'explique par l'exposition répétée à des agents stressants ayant pour conséquence la dépression [196]. Dans cette perspective, des stress peuvent être appliqués chez le rongeur afin d'évaluer leur état de dépression. L'état

dépressif se définit par le désespoir comportemental de la souris de ne pouvoir s'échapper de cette situation de stress. Dans cette situation, la souris cesse toute tentative d'évasion et devient immobile [197]. À l'heure actuelle, l'un des modèles les plus utilisés est le modèle de résignation apprise. Ce modèle consiste à soumettre l'animal à un stress en le suspendant par la queue à un accroc. Ce test est communément appelé « *Tail suspension test* » [198] voir annexe Figure 22. Le comportement de résignation est évalué en analysant les performances des animaux dans un contexte où ils ne peuvent s'échapper du stress infligé. Le test est d'une durée d'environ 6 minutes et le temps d'immobilité de la souris est enregistré par un logiciel conçu à cet effet. Chaque souris est suspendue par la queue au moyen d'un ruban adhésif magnétique relié à un crochet qui enregistre tous les mouvements de la souris et les transmet à une unité centrale qui numérise les signaux. Cette attitude d'immobilité a été inventée à l'origine par Porsolt en 1978 [199] qui l'a décrite comme « le désespoir comportemental » autrement dit, que les animaux ont « renoncé à l'espoir de s'échapper ». Durant ces dernières années, le test de suspension caudale a souvent été utilisé en tant que modèle pour l'évaluation de l'état de dépression chez les souris [200]. Le comportement de résignation est affecté dans différents modèles animaux de dépression comme ceux induits par des stress chroniques répétés ou encore par un stress prénatal [201, 202]. Il faut toutefois garder à l'esprit que tout modèle animal d'une pathologie psychiatrique humaine est limité. En effet, le modèle animal fondé sur la suspension caudale n'est pas une simulation réaliste de la pathologie humaine. Toutefois, il permet de reproduire certaines altérations comportementales et neurobiologiques semblables à celles observées dans la pathologie humaine.

L'engouement pour leur intérêt nutritionnel ne faisant que croître, les nombreuses études qui en découlent impliquent dorénavant les N-3 dans de nombreux mécanismes

physiologiques [203, 204] et ils semblent diminuer les symptômes de plusieurs maladies du système nerveux telle que la dépression [170, 200, 205-207]. Puisque la consommation en N-3 a diminué dans la plupart des populations, la fréquence de la dépression majeure a pour sa part considérablement augmenté [208]. Ce constat est appuyé en considérant les pays côtiers (la Norvège, le Japon) où la consommation de poisson est importante et où le pourcentage de dépression est faible [207]. Les études comparatives internationales sur la prévalence de la dépression majeure rapportées par Weissman et ses collègues [209] sont parmi les données nationales transversales disponibles les plus fiables. Toutefois, les auteurs ont pris le soin de mentionner dans leur conclusion que cette corrélation entre la faible consommation apparente de poissons et l'augmentation de la prévalence annuelle de la dépression majeure ne démontre pas que la consommation de poisson puisse causer des différences dans la prévalence de la dépression majeure. Divers autres facteurs (culturels, économiques, sociaux) peuvent confondre cette simple relation de corrélation. Chiu et al. [210] ont quant à eux émis l'hypothèse que l'humeur dépressive survenant chez la femme en postpartum serait liée au fait que l'enfant ait épuisé les réserves de la mère en N-3. Chez des rats soumis à un stress, une supplémentation chronique en AGPI N-3 dans une phase précoce du développement du cerveau (du 21<sup>e</sup> au 134<sup>e</sup> jour de vie) prévient l'apparition des comportements liés à l'anxiété et à la dépression ainsi qu'aux troubles d'apprentissage et de la mémoire [211]. L'ensemble de ces résultats ont donné lieu à des recommandations portant sur l'apport bénéfique d'huile de poisson riche en N-3 dans la lutte contre la dépression [210].

Mis à part des signaux internes et ceux liés aux facteurs émotionnels, plusieurs facteurs pourraient être considérés comme étant des signaux externes difficilement contrôlables ou mesurables [212]. Parmi ces signaux pouvant influencer la balance énergétique, nous pouvons

citer des facteurs d'ordre socio-économiques ou cognitif, les habitudes culturelles et alimentaires.

### **1.3.5 Signaux externes**

Aujourd'hui, nous sommes continuellement influencé par différents stimuli nous incitant à consommer des produits alimentaires à haute densité calorique, au goût agréable mais trop souvent riches en gras et en sucre [213, 214] pouvant influencer la balance énergétique et causer l'obésité [215]. De plus, les humains ne brûlent plus des milliers de calories quotidiennement pour accéder à leur nourriture puisqu'elle est à la portée de la plupart d'entre nous. Cette disponibilité alimentaire et l'abondance d'aliments variés viennent renforcer la surconsommation déjà induite par des aliments savoureux [216] et ce, sans oublier l'accessibilité des aliments [217, 218] favorisant le développement de l'obésité. Nous combattons un environnement obésogène qui nous envoie sans cesse des signaux nous incitant à manger constamment.

Outre les facteurs liés à l'environnement général celui in utero est une étape de développement du fœtus qui intervient de manière significative dans l'apparition ou non de surpoids et de maladies chroniques. Barker fut d'ailleurs le premier à émettre l'hypothèse de la « pierre angulaire » en stipulant qu'une sous-alimentation fœtale augmente les risques d'apparition de surpoids associé à une incidence plus fréquente des MCV à l'âge adulte [219]. C'est pourquoi, si le développement d'un individu se divise en plusieurs stades critiques, souvent limités et brefs, les mécanismes de développement du SNC ne sont pas les mêmes en périodes postnatale et prénatale. Selon le concept général de programmation fœtale, un stimulus ou un stress quelconque survenant durant les périodes critiques du développement

pourrait entraîner des conséquences à long terme sur les descendants et cela même après la disparition du stimulus déclencheur [220, 221]. Plus spécifiquement, Plagemann a proposé le concept de la « **programmation périnatale** » pour le fonctionnement des systèmes de régulation et il a démontré qu'on pouvait prévenir l'obésité durant cette période [222]. Pour sa part Lucas, a réalisé que la nutrition précoce pouvait influencer prématurément le développement de l'individu en causant des modifications physiologiques et métaboliques durables [223] d'où l'appellation de « **programmation métabolique** ». La figure 5 représente les différentes périodes critiques de développement au cours desquelles se produirait la programmation intra-utérine. La période périnatale, comprenant la période prénatale et post-natale jusqu'au sevrage, représente une phase critique du développement puisque pendant cette période, la plasticité cellulaire est maximale et que la sensibilité de l'individu aux différents facteurs s'accroît.

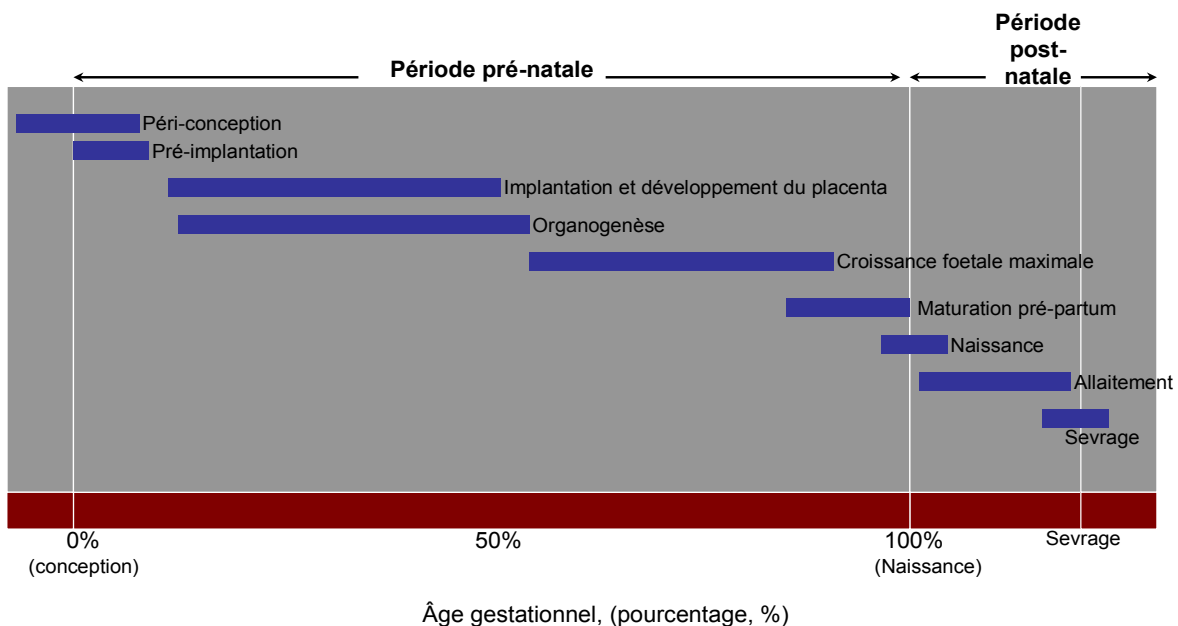


Figure 5 : Périodes critiques du développement au cours desquelles se produirait la programmation intra-utérine. D'après [Source : d'après Fowden et al. [220]].

Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer l'existence de l'obésité pouvant être génétiques et épigénétiques, psychologiques, endocriniennes ou environnementales [224-226]. Dans les années 60, Neel a émis l'hypothèse que ces altérations surviennent prématurément par les modifications au niveau des gènes, d'où l'hypothèse d'un « **génotype économe** » [227]. D'autres auteurs généralisent ce concept en « **phénotype économe** » puisqu'ils considèrent qu'une restriction alimentaire en nutriments aura des conséquences néfastes sur la croissance fœtale en régulant le métabolisme de la sécrétion de l'insuline et du glucose dans le but ultime de permettre à l'organisme de survivre à de futures conditions nutritionnelles restreintes [228]. Dans un contexte plus large, des auteurs ont proposé un cadre conceptuel décrivant l'implication de cette programmation par l'apparition du syndrome métabolique en altérant la physiologie de plusieurs organes. Parmi les organes impliqués on retient le tissu adipeux, le muscle, le foie, le pancréas, le système cardiovasculaire, le cerveau. La figure 6 représente le rôle contribuant de l'environnement materno-fœtal sous-optimal (carences alimentaires, diabète gestationnel, obésité maternelle) dans la programmation du développement du métabolisme énergétique cellulaire en faveur du stockage lipidique.

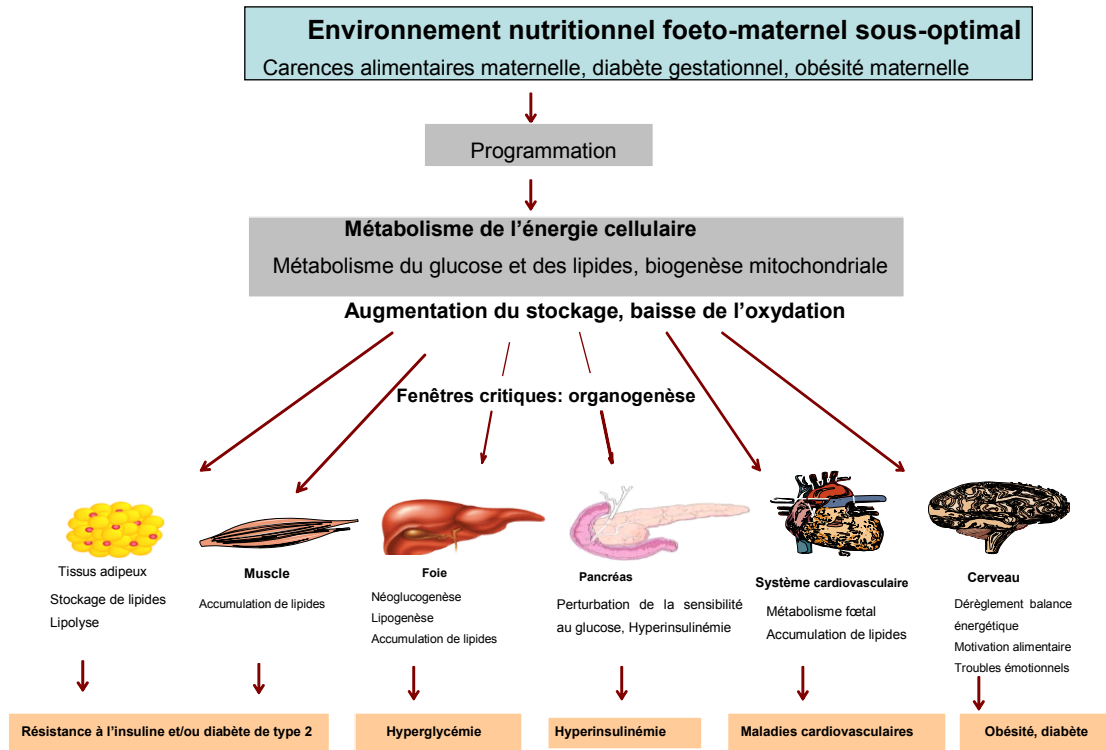


Figure 6 : Rôle de l'environnement foeto-maternel sur la programmation métabolique en faveur de la réserve des lipides Image modifiée [229].

Afin de simplifier la lecture de cette thèse et dans une perspective plus précise de neuroscience nutritionnelle, nous allons nous intéresser au cerveau. Les carences alimentaires maternelles pour certains nutriments essentiels comme les AGPI altèrent le métabolisme énergétique entraînant ainsi des troubles émotionnels et de motivation alimentaire pouvant développer l'obésité et le diabète chez la progéniture. Le prochain chapitre fera état des connaissances sur les AG et en particulier des N-3 et des récepteurs membranaires spécifiques auxquels ils sont liés.

## 1.4. Acides Gras polyinsaturés

### 1.4.1. Classification

Les AG en général sont des molécules organiques composées d'une chaîne carbonée variant le plus souvent entre 12 et 22 atomes de carbone, d'un groupement carboxyle (COOH) et d'un groupement méthyle (CH<sub>3</sub>) aux extrémités terminales. En fonction du nombre de carbone, on distingue les AG à courte chaîne (moins de 6 atomes de carbone), à chaîne moyenne (6 à 12 atomes de carbone), les acides gras à chaîne longue (AGLC) (12 à 24 atomes de carbones) et finalement des acides gras à très longue chaîne comptant plus de 24 atomes de carbone [230]. Lorsque la chaîne carbonée est dépourvue de doubles liaisons les AG sont appelées des acides gras saturés (AGS) et lorsqu'elle présente une ou plusieurs doubles liaisons on les nomme des acides gras insaturés (AGI). Les AGI sont divisés en acides gras monoinsaturés (AGMI) puisqu'ils contiennent une insaturation carbone-carbone et des acides gras polyinsaturés (AGPI) dont la chaîne hydrocarbonée contient au moins 2 insaturations (ou doubles liaisons)

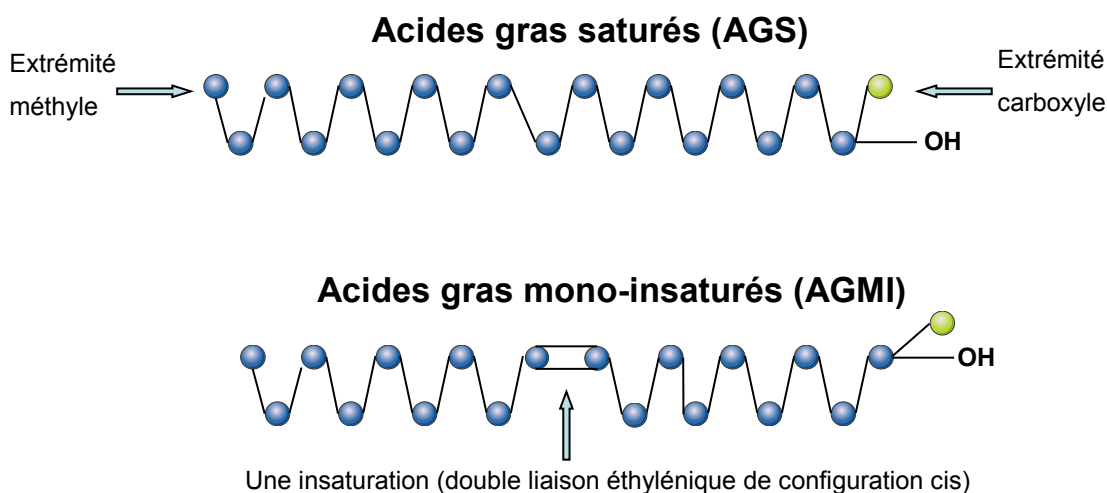


Figure 7 : Structure des principales familles d'acides gras Source adaptée [231].



Dans la représentation schématique des AG, la chaîne hydrocarbonée est représentée par une succession de sphères (atomes de carbone) reliées entre elles par des liaisons covalentes.

La classification des AGPI s'établit en 3 familles, les AGPI de la série N-3 (oméga 3,  $\omega$ -3) provenant de l'acide alpha-linolénique (ALA), ceux de la série N-6 (oméga-6,  $\omega$ -6) provenant de l'acide linoléique (LA) et ceux de la série N-9 (oméga-9,  $\omega$ -9). La différence entre ces familles vient de la position de la première double liaison à partir de l'extrémité méthyle terminale de l'AG se situant entre le 3<sup>e</sup> et le 4<sup>e</sup> carbone pour les AGPI N-3, entre le 6<sup>e</sup> et le 7<sup>e</sup> carbone pour les AGPI N-6 et entre le 9<sup>e</sup> et le 10<sup>e</sup> pour les AGPI N-9. Par exemple, le 18:2n-6 est composé de 18 atomes de carbone, 2 doubles liaisons et la position de la première double liaison est sur le carbone 6. Pour le 18 :3n-3, il est composé de 18 atomes de carbone, 3 doubles liaisons et la position de la première double liaison se situe sur le carbone 3.

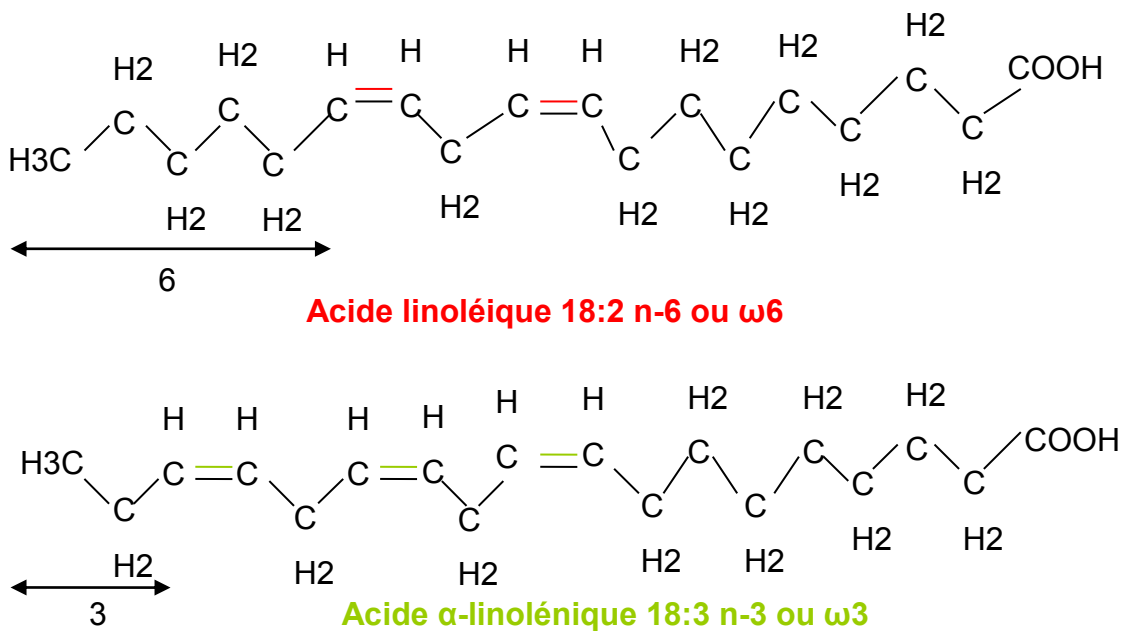


Figure 8 : Formule chimique des acides gras polyinsaturés. Schéma extrait de [www.123bio.net](http://www.123bio.net)

## 1.4.2. Sources

L'acide linoléique (LA) et  $\alpha$ -linoléique (ALA) sont les seules sources d'acides gras polyinsaturés à longues chaînes (AGPI-LC). Les vertébrés sont incapables d'effectuer la synthèse de novo de ces deux AGPI essentiels puisqu'ils doivent provenir de l'alimentation [232]. Parmi les sources alimentaires les plus riches en AGPI-LC N-3 qui sont composés d'acide éicosapentaénoïque (APE) et d'acide docosahéxaénoïque (ADH), nous pouvons nommer tous les poissons gras d'eau froide tel le saumon, le maquereau, la sardine et le thon (faibles en gras saturés mais riches en nutriments, protéines) [233, 234] ainsi que les graines de lin, de chanvre et les noix [235]. Les produits animaux comme la viande, la volaille, les œufs et le lait contiennent majoritairement des dérivés N-6 et des quantités variables de N-3 selon le régime de ces animaux [236].

L'ALA est une source alimentaire limitée répondant aux besoins de l'organisme en ADH et plus particulièrement le SNC [237]. Les études ont démontré chez l'homme adulte que le taux de conversion du ALA, 18:3n-3 en ADH est inférieur à 1 % [238]. Toutefois, ce taux est plus élevé chez la femme (probablement en raison du statut hormonal et des œstrogènes) [239]. Selon les recommandations de l'OMS, les AGS, mono et polyinsaturés doivent représenter respectivement moins de 10 %, entre 10-15 % et 5-10 % de l'énergie fournie par les lipides. Actuellement on estime qu'environ 67-75 mg/jour d'ADH sont accumulés in utero pendant le dernier trimestre de gestation [240, 241]. À cet effet, les recommandations cliniques pour la supplémentation pendant la grossesse sont communes quoique les sources et les doses soient variables [242].

### 1.4.3. Rôles

Le premier rôle des AGPI est d'intervenir directement au sein de la fluidité membranaire, la perméabilité membranaire ainsi que dans les nombreuses voies de signalisation intracellulaire [243, 244]. Plus le degré d'insaturation des AGPI est élevé et plus la membrane est flexible [245]. La multiplicité de leurs rôles dans de nombreux processus physiologiques leur confère une importance sur la santé et les maladies chroniques comme la régulation du taux plasmatique de lipides [246, 247], des fonctions immunitaires [248, 249] et du risque de diabète ou d'obésité [35, 250-252]. Ils ont été également impliqués dans les fonctions visuelles [243, 244, 253-255], cognitives [256-262], du flux membranaire [15] et l'agrégation plaquettaire [205].

### 1.4.4. Voies métaboliques

La figure 10 illustre la voie de biosynthèse des AGPI à partir des deux précurseurs indispensables l'acide linoléique, (LA; 18:2n-6) un précurseur métabolique pour les AG N-6 et l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA; 18:3n-3) pour les N-3 qui sont exclusivement d'origine végétale et ne sont pas synthétisés par les vertébrés. Il est à noter ici que contrairement aux cellules végétales, les mammifères ne possèdent pas les désaturases  $\Delta 12$  et  $\Delta 15$  permettant d'introduire des doubles liaisons à l'extrémité méthyle. C'est ainsi que l'acide arachidonique (AA; 20:4n-6) est synthétisé à partir de LA et qu'à partir de ALA les acides eicosapentaénoïque (APE; 20:5n-3) et l'acide docosahexaénoïque (ADH; 22:6n-3) le sont aussi.

L'acide docosapentaénoïque (ADP; 22:5n-3,) est d'abord allongé en acide tétracosapentaénoïque (ATP; 24:5 n-3) pour ensuite être désaturé sous l'action de la  $\Delta 6$

désaturase afin de produire l'acide tétracosahexaénoïque (ATH; 24:6 n-3). Finalement, l'ATH est transféré dans les peroxysomes pour générer l'acide docosahexaénoïque (ADH; 22:6n-3) sous l'action d'une  $\beta$ -oxydation.

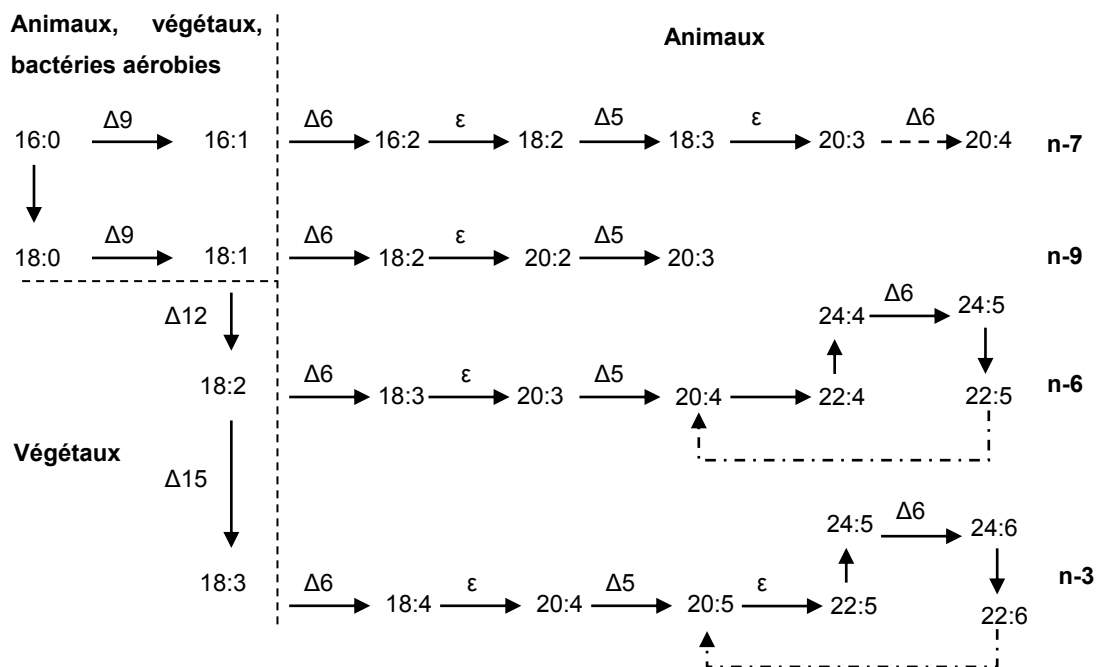


Figure 9 : Biosynthèse des acides gras d'origines animale et végétale.

Source adaptée : [263].

Le symbole  $\Delta$  indique une désaturation avec la place de la double liaison introduite à partir du groupe carboxyle COOH. Le symbole  $\epsilon$  indique une élongation. Les familles n-7 et n-9 ne sont pas essentielles puisque leur précurseur est synthétisable par l'homme et l'animal. Les acides gras des familles n-6 et n-3 constituent les acides gras essentiels.

### - Catabolisme oxydatif

Les AGPI à 20 atomes de carbone [acide dihomom- $\alpha$ -linoléinique (DGLA, 20:3n-6) ARA] conduisent à la formation de puissants médiateurs de la signalisation cellulaire (les éicosanoïdes) suite à des processus enzymatiques d'oxygénation, d'hydroxylation et de peroxydation. Parmi les éicosanoïdes on retrouve les prostaglandines, les leucotriènes et les

thromboxanes [231]. Les leucotriènes et la prostaglandine E2 (PGE2) exercent des effets pro-inflammatoires par les monocytes, macrophages, basophiles, mastocytes et neutrophiles [264]. A l'opposé, la conversion enzymatique de l'APE et de l'ADH conduit à la formation de résolvines et de neuroprotectines jouant respectivement un rôle anti-inflammatoire et anti-apoptotique dans le cerveau [265]. Les thromboxanes (TX) sont vasoconstricteurs et de puissants agents hypertenseurs puisqu'ils facilitent aussi l'agrégation plaquettaire. Leur nom provient de leur rôle dans la formation du caillot (thrombose).

### **1.4.5 Effets bénéfiques connus pour la santé**

Parmi les AGPI, les N-3 sont apparus comme étant des lipides d'une importance prioritaire pour la santé humaine. Une consommation d'au moins de 250-500 mg/jour d'ADH pour les adultes en bonne santé apparente est recommandée. Cependant jusqu'à ce qu'un consensus sur les apports nutritionnels de référence (ANREF, ou Dietary Reference Intakes DRI) ne soit établi, les professionnels de la santé continueront à exprimer des réserves sur les recommandations pour la consommation optimale d'ADH. Bien qu'aucune autre autorité n'ait rapporté d'effets indésirables avec des niveaux de consommation ne dépassant 5-6 g/jour d'APE et d'ADH [266, 267], la «Food and Drug Administration» (FDA) a déclaré que des niveaux n'excédant pas 3 g/jour sont reconnus comme étant sécuritaires [268].

#### **1.4.5.1. Les oméga-3 et les maladies cardiovasculaires, diabète, obésité**

Les premiers effets bénéfiques des N-3 ont été décrits dans les cas de MCV et plus particulièrement de maladies coronariennes [269] pour la prévention de la thrombose [270] et de l'athérosclérose [271] associée à un effet anti arythmique [272]. Deux études en prévention

primaire [273, 274] ont démontré respectivement que les sujets dont la concentration sérique en N-3 est plus forte bénéficient d'une réduction de 81 % du risque de mort subite et qu'une consommation en N-3 supérieure à 0,7 g par jour permettait une réduction de 40 % du risque coronarien. Une recherche en prévention secondaire [273] faite sur des personnes ayant survécu à un premier accident cardiovasculaire (ACV) a révélé que chez des survivants d'infarctus du myocarde (IDM), une supplémentation en N-3 associée à une diète méditerranéenne entraînait une réduction de 23 % du risque de mort subite sur une période de 3.5 ans.

Il est maintenant bien admis par la recherche médicale que la meilleure prévention et le meilleur traitement du diabète passent également par une approche nutritionnelle. Ainsi, *l'American Diabetes Association* recommande un apport d'huile de poisson riche en N-3 aux patients souffrant du diabète. Une étude norvégienne a démontré que la prise d'huile de foie de morue riche en N-3 par de jeunes enfants diminue de façon significative le risque de développer ultérieurement un diabète [275]. Il a d'ailleurs été établi que la prise quotidienne d'huile de poisson avait un effet neuroprotecteur face aux complications du diabète [276].

Une étude menée chez des rats nourris soit avec un mélange de lard et d'huile d'olive sans N-3 ou avec des huiles de poisson qui ne diffèrent que par la quantité d'AGPI de 20 ou 40 % N-3, a démontré après 4 semaines sur ces régimes que ceux nourris avec l'huile de poisson présentaient un tissu adipeux de 2 à 5 fois moins importants par la réduction du volume des adipocytes. Une supplémentation en N-3 (APE/ADH) produit une action directe sur le tissu adipeux « antiadipogénique » et ce, par une diminution de la prolifération des

adipocytes et celle des réserves de graisses activée par une augmentation de la bêta oxydation et par une diminution de l'activité de l'AG synthétase [277].

#### **1.4.5.2 Les oméga-3 et l'anxiété, la dépression, les troubles neurologiques**

Une fonction antistress a été attribuée à ces acides gras [211]. Le stress se rapporte à l'adaptation fonctionnelle organique causée par une pression extérieure. La fonction antistress évoquée dans notre travail se rapporte à la capacité qu'ont les acides gras oméga-3 d'influencer l'ensemble de la chaîne des réactions biologiques conduisant au stress. La littérature scientifique rapporte que la supplémentation d'un régime en AGPI N-3 peut non seulement contrecarrer l'effet anxiogénique produit par un agent stressant mais peut également réduire drastiquement le niveau plasmatique de corticostérone (hormone liée au stress) [278]. Sawazaki et al. ont réalisé une étude auprès d'étudiants en médecine soumis à des stress d'examen et à qui on donnait un supplément d'ADH en capsules (soit 1.5 g/jour). Au terme de 9 semaines et après plus de 20 examens stressants, la prise d'ADH avait modifié le niveau plasmatique des catécholamines (épinéphrine, norépinéphrine et dopamine) et de cortisol. Ils en ont conclu que ces effets d'ADH peuvent être appliqués aux personnes exposées aux stress psychologiques de moins longue durée dans le but de prévenir les maladies liées au stress [279]. Néanmoins, le mécanisme précis par lequel ils induisent cet effet reste encore méconnu. Afin de déterminer si les AGPI N-3 diminuent la production de cytokine pro-inflammatoire et des symptômes dépressifs et d'anxiété chez les jeunes adultes en santé, Kiecolt-Glaser et al. [280] ont mené une étude de contrôle randomisé pendant 12 semaines auprès des étudiants en médecine. Les participants ont fourni des échantillons sanguins en série au cours des périodes de stress minime ainsi que durant les jours précédant un examen très stressant. Ils ont reçu des

capsules de placebo ou des capsules de suppléments en AGPI  $\omega$ -3 (2,5 g/j, AEP et ADH) qui reflétaient les proportions d'AG dans le régime alimentaire américain typique. Comparativement aux témoins, les étudiants ayant reçu les AGPI N-3 ont démontré une diminution de 14 % en lipopolysaccharides (LPS) venant stimuler la production de l'interleukine 6 (IL-6) et réduire de 20 % des symptômes d'anxiété sans changement significatif des symptômes dépressifs. Ces données suggèrent que la supplémentation en N-3 peuvent réduire l'inflammation et l'anxiété et ce, même parmi les jeunes adultes en santé [280]. Une autre étude Néo-Zélandaise plus ancienne a conclu que les AG oméga-3 pourraient jouer un rôle de stabilisateurs de l'humeur puisqu'il existait une corrélation entre la perception personnelle d'un meilleur état de santé mentale, physique et la consommation de poisson [281]. Le rôle potentiel des N-3 et en particulier de l'ADH provoque ou procure une réaction pouvant prévenir et traiter le déclin cognitif [258, 282]. Un déficit alimentaire en AGPI N-3 très tôt dans la vie est associé aux Troubles du déficit de l'attention avec hyperactivité (TDAH) pendant l'enfance [283]. C'est ainsi qu'une étude avait pour objectif de déterminer la composition des AG ainsi que l'efficacité et l'innocuité d'une supplémentation en AGPI N-3 sur les symptômes cliniques de TDAH d'enfants canadiens français du primaire. Les chercheurs de cette étude randomisée à double aveugle ont conclu qu'un sous-groupe d'enfants ayant un TDAH et qui ont pris le supplément d'AGPI N-3 ont réussi à contrôler leurs symptômes et à maintenir ce contrôle. Ils ont également conclu que l'innocuité et la tolérabilité des AGPI N-3, mais les changements observés étaient limités dans le profil d'AG des Canadiens français ayant un TDAH. Colter et al. ont également établi dans leur étude une corrélation entre le statut déficitaire en AGPI et des niveaux élevés d'hyperactivité chez des enfants d'âge préscolaire [284]. La recension des écrits sur des études cliniques et sur chez les



animaux rapporte les effets de la carence ou de supplémentation alimentaire en AGPI N-3 sur le comportement et elle attribue une fonction antistress possible de ces AG. Cependant, le mécanisme précis de cet effet antistress des AG n'est pas encore bien documenté.

Précisons toutefois, que divers travaux ont analysé les relations entre le statut en acides gras N-3 et des facteurs comportementaux tels que le stress ou l'humeur. Comme référence précédemment, Silvers et Scott dans l'étude Néo-Zélandaise [281], ont rapporté une meilleure perception personnelle de l'état de santé mentale et physique proportionnelle à la consommation de poisson. Toutefois, une autre étude chez les humains démontrait que la consommation de poissons n'améliorait pas l'humeur de personnes non dépressives [285]. Il se pourrait que l'augmentation de la consommation de poisson contenant les AG N-3 chez les personnes saines sans symptômes dépressifs n'ait donc aucun effet important sur l'humeur. Il faudrait considérer également dans les études humaines, comme l'ont rapporté Buynitsky et Mostofky [286] que les adaptations de l'axe HPA à un stress chronique semble être dépendant du type, de la fréquence, la durée et de l'intensité du stress. Un autre point important à souligner, est que le poisson en plus d'être riche en N-3 contient d'autres composants pouvant également être responsables d'effets bénéfiques. Tel par exemple l'iode, le sélénium, la vitamine B12, entre autres, dont l'impact sur le cerveau est considérable. Pour toutes ces raisons, nous avons donc pris le soin de rédiger que les oméga-3 permettraient de réduire le stress.

### **1.4.5.3. Importance ratio N-6/ N-3**

Les deux familles d'AGPI, N-6 et N-3 ne sont pas interconvertibles mais leurs voies de synthèse entrent en compétition puisqu'elles utilisent les mêmes désaturases et élongases, ce

qui implique un effet de « balance métabolique » entre ces deux familles [287]. Un déséquilibre des apports en AGPI N-6 et N-3 n'est pas sans conséquences sur l'ensemble des systèmes physiologiques de notre organisme puisqu'un ratio N-6/N-3 élevé favorise la fréquence de nombreuses maladies chroniques telles que les maladies inflammatoires [56], les MCV [57], l'ostéoporose [288], les cancers [289], le diabète ou l'obésité [58], la dépression [59], la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) [290] et la maladie d'Alzheimer (MA) [291]. Cette concurrence de proportion entre les N-6 et les N-3 dans la composition membranaire survient également en cas de déficit alimentaire en ADH pouvant entraîner des risques majeurs pour le bon fonctionnement neuronal de différents organes [292]. Les N-3 permettraient de réduire le stress oxydatif dont l'augmentation des apports alimentaires en N-3 par rapport aux N-6 provoquent une augmentation de la production d'enzymes antioxydantes et l'arrêt de la production d'espèces réactives oxygénées et azotées (radicaux libres) [293].

Une supplémentation alimentaire avec des doses croissantes d'ALA induit l'accumulation plasmatique d'APE sans pour autant augmenter la teneur plasmatique en ADH [294]. Toutefois l'apport excessif en LA, au détriment de l'ALA, provoque une augmentation de la synthèse et de l'incorporation de l'AA dans les phospholipides membranaires de différents organes comme le foie, le tissu nerveux et ceci au détriment des dérivés supérieurs des N-3 tel que l'APE et l'ADH. Cette augmentation de la synthèse de l'AA inhibe par affinité enzymatique la biosynthèse des AGPI à longue chaîne, à savoir la bioconversion de l'APE (réduction synthèse). Ainsi, l'augmentation de la synthèse de l'AA entraîne une augmentation de la synthèse de l'ADP, qui par affinité enzymatique, en particulier pour les désaturases, réduit la synthèse de l'ADH. Lorsque ce déséquilibre survient, l'augmentation de l'incorporation de l'AA dans les phospholipides membranaires au détriment des dérivés

supérieurs en N-3 s'effectue dans l'ensemble des membranes tissulaires de l'organisme et en particulier dans le tissu nerveux pendant la période périnatale de développement cérébral. C'est pour cette raison que le rapport LA/ALA est un facteur important de l'équilibre nutritionnel en AGPI N-6 et N-3 durant cette période.

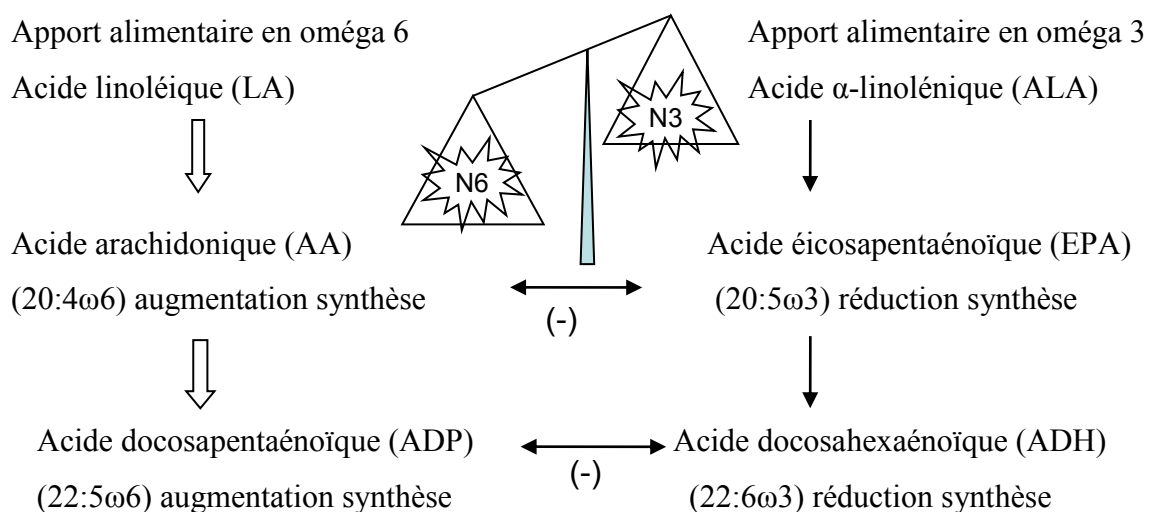


Figure 10 : Conséquences d'un apport alimentaire déséquilibré en acide linoléique/acide α-linolénique sur la biosynthèse des AGPI à longues chaînes. Source : [231]

### 1.4.6. Importance pour le cerveau

Dans une évaluation réalisée par Delplanque et al. (2012) sur la manière dont l'ALA peut améliorer le contenu cérébral de jeunes rats mâles nés de mères carencées, les auteurs ont rapporté que les produits laitiers sans mélange de gras mais enrichis en ALA semblaient être une stratégie intéressante pour atteindre les niveaux optimaux en ADH dans le cerveau en période post-sevrage chez le rat [295]. Neuringer et al. ont quant à eux démontré chez des singes rhésus femelles gravides placées sous régime déficitaire en N-3 une faible réduction des taux en N-3 parmi les lipides plasmatiques. Les taux plasmatiques d'ADH étaient plus élevés chez les nouveau-nés que chez leur mère et ce, malgré des taux réduits [296]. Cela explique

comment l'organisme, même en cas de déplétion, achemine ses réserves vers le fœtus au détriment de la mère puisque le fœtus et le placenta dépendent entièrement de l'apport maternel en ADH pour la croissance et le développement du fœtus [42].

#### **1.4.6.1. Statut lipidique cérébral**

Le métabolisme lipidique tant dans la structure que dans le fonctionnement cérébral joue donc un rôle déterminant [297]. Après le tissu adipeux le cerveau est l'organe qui contient la plus forte proportion de lipides, soit de plus de la moitié du poids sec de l'organe [298]. Environ le tiers (33 %) d'AGPI, particulièrement l'ADH qui compte à lui seul 50 % des AGPI cérébraux constituent les phospholipides membranaires des cellules du SNC et la composition de cette bicouche phospholipidique des membranes cérébrales est influencée par ces apports [299].

#### **1.4.6.2 Mode de transport**

Lors de la digestion les lipides alimentaires sont digérés au niveau du tube digestif par les enzymes pancréatiques et des sels biliaires afin de former les micelles mixtes contenant des AGL et des 2-mono-acylglycérols. Durant leur absorption dans l'intestin grêle par les entérocytes, ils sont acheminés vers le réticulum endoplasmique où ils sont recombinaés en triacylglycérols puis transportés vers les tissus utilisateurs et le tissu adipeux sous formes de chylomicrons. Les lipides alimentaires parviennent donc dans la circulation systémique sous forme de chylomicrons par voie lymphatique (sans passer par le foie) ou encore directement au foie s'il s'agit de triglycérides à chaînes moyennes. Les AGL issus de la lipolyse sont liés à l'albumine et libérés dans le plasma.

Le transport de composés essentiels et de nutriments entre la mère et le fœtus se fait à travers le placenta [300]. Des études intéressantes ont pu démontrer que le cerveau peut rapidement capter des AG tels que l'ADH, l'AA et l'acide palmitique lorsqu'ils sont libérés à partir de l'albumine [301]. Toutefois, le type d'AG et le mode de livraison sont des conditions *sine qua non* pour traverser la barrière hématoencéphalique (BHE).

### ❖ Barrière Hématoencéphalique (BHE)

Cette barrière a été décrite pour la première fois en 1885 par Paul Ehrlich [302] qui a observé que certains colorants injectés par voie intraveineuse se retrouvaient au niveau du parenchyme cérébral. Cette barrière est représentée anatomiquement par une couche endothéliale de cellules qui sont scellées par des jonctions serrées [303] et d'autres types cellulaires telles que les cellules gliales et les péricytes qui entrent directement en contact avec les cellules endothéliales [304, 305]. Son rôle principal est de contrôler les entrées et les sorties d'éléments nutritifs ou toxiques dans le système nerveux central [306, 307]. La figure 11 illustre la barrière hématoencéphalique.

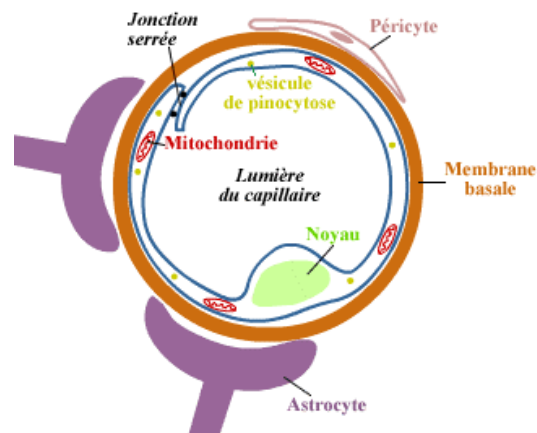


Figure 11 : Représentation schématique de la barrière hématoencéphalique.

Source Goldstein et Betz (1986) [308].

Les systèmes de transport des lipides engagés dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique n'étant pas encore totalement décodés ont amené quelques chercheurs à proposer plusieurs mécanismes puisque la plupart de ces signaux sont lipophobes et ne peuvent pas être librement diffusés à travers les capillaires cérébraux. C'est pourquoi plusieurs modèles de transport ont été proposés.

#### ❖ **Modèle de transport membranaire**

John Edmond fut le premier à proposer que le transport des AG à travers la BHE soit tiré principalement du complexe AG/Albumine [309]. Dans le sang, ces lipoprotéines sont captées par des récepteurs de la surface externe de la cellule endothéliale pour être libérée dans le milieu intracellulaire endothéliale par lipolyse des AG estérifiés. Dans le cytoplasme de la cellule endothéliale et pour passer à travers la BHE, ces acides gras nécessitent des transporteurs transmembranaires: les MTC (monocarboxylic acid transporters) et les FATP (fatty acid transport proteins) [309]. Concernant les cellules neuronales et gliales, les AG peuvent se répandre dans le milieu aqueux cytosolique à l'état libre ou liés aux protéines FABPs (fatty acid binding proteins) [310, 311].

Le modèle d'Hamilton et de Brunaldi [312] stipule au contraire que le type de transport très rapide des AG dans le cerveau à travers la BHE dont propose Edmond n'est pas compatible avec ce qui se passe en réalité puisque plusieurs étapes pourraient être ralenties. À titre d'exemple ; celle de la lipolyse des lipoprotéines et l'augmentation de protéines de transport dans la membrane cellulaire. Ces deux chercheurs stipulent que les AG dans le sang étant en équilibre avec la réserve d'AG liés à l'albumine se lient en premier lieu au milieu interstitiel de la surface des cellules endothéliales pour se répandre par la suite à travers la

surface interstitielle en traversant les cellules endothéliales et la membrane des cellules neuronales par le mécanisme réversible de « flip-flop » ( $t_{1/2} < 1 \text{ sec}$ ) [313]. Ce mécanisme de diffusion passive est utilisé préférentiellement par les AG à chaîne courte et moyenne qui traversent aisément la bicouche lipidique en raison de leur coefficient de perméabilité élevé se faisant sans présence de transporteur à travers la BHE. Les AG à longue chaîne, étant moins solubles, présentent plus de difficultés à utiliser ce type de transport membranaire facilité. De plus, la forme non-ionisée des AG se déplace plus aisément et plus rapidement à travers la membrane que la forme ionisée [314, 315].

Il a été démontré que les lipides circulants peuvent aisément traverser cette barrière et peut se distribuer au cerveau [316, 317]. Les AG à chaîne courte peuvent traverser la BHE par un mécanisme saturable sensible à la probénécide [318]. Les AGS et les AGPI-LC tout comme l'ADH et l'AEP diffusent, fusionnent, s'incorporent et passent à travers la microvascularisation cérébrale [301, 319-321]. D'autres études ont démontré que les triglycérides pénètrent également à travers la BHE [322]. Le passage d'ADH et d'AEP à travers la BHE se fait plus particulièrement par diffusion passive, de manière directe non saturable [44, 301] ou par un procédé de médiation dans l'hippocampe [323] ou mieux encore par un membre de la grande famille de super- animateur , Mfsd2a [324].

### **1.4.6.3 Synthèse dans le cerveau**

Parmi les AG essentiels et abondants dans le cerveau on retrouve l'ADH et l'AA. Tel que mentionné précédemment, ils ne sont pas synthétisés de manière de novo dans le cerveau [325] puisqu'ils doivent donc être fournis directement ou bien par leurs précurseurs à partir de sources exogènes. La synthèse de novo d'AEP et d'ADH par l'ALA présente une

concentration cérébrale très minime qui varie entre 0,01 % et 8 % d'ALA pour l'AEP et moins en ADH [326, 327]. La source principale d'ADH pour le cerveau est d'origine plasmatique [328, 329] et le cycle métabolique de l'ADH dans le cerveau est évalué pendant une durée de 33 jours chez des souris et de 2 ans et demi chez des humains [329, 330]. La Figure 12 représente approximativement les différents teneurs d'ADH et d'AA dans différentes zones cérébrales. Les N-3 en général constituent à eux seuls entre 15 et 20 % des AG retrouvés dans les membranes des cellules cérébrales [331-333] alors que l'AEP est pratiquement indétectable dans les tissus cérébraux [334]. Environ 5 % AA et 8 % ADH [317] présents sous forme d'esters dans les phospholipides membranaires dans le cerveau des rats se renouvellent quotidiennement.

Ces niveaux lipidiques membranaires cérébraux sont modifiés par le type et la quantité d'acides gras contenu dans l'alimentation en augmentant au cours des différents stades de développement de la vie et en diminuant au vieillissement [42]. Dépendamment de la zone cérébrale, la teneur en AG diffère d'une structure à l'autre.

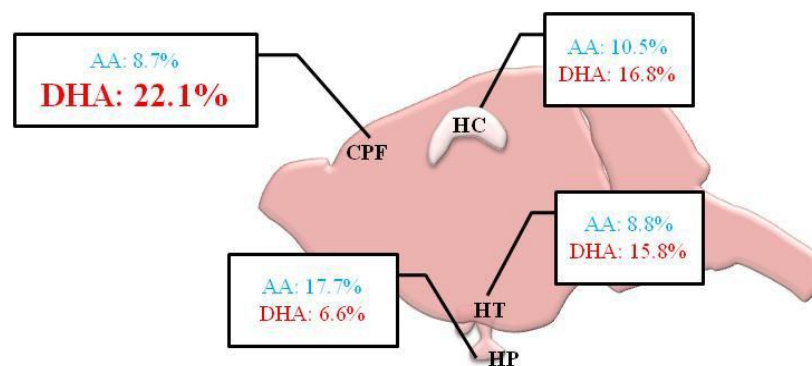


Figure 12 : Teneurs en DHA et en AA dans les structures cérébrales de la souris.

AA: Acide arachidonique, DHA: Acide docosahexaénoïque, CPF: cortex préfrontal, HC: hippocampe, HT: hypothalamus, HP: hypophyse. Les valeurs sont données en % d'acides gras totaux (adapté de Carrie et al., 2000) [335].



#### **1.4.6.4 Développement cérébral**

La plus grande partie du développement cérébral s'effectue pendant la vie fœtale. Chez l'humain, à la naissance, le poids corporel du nouveau-né représente seulement 5 % du poids adulte alors que la taille de son cerveau représente déjà 70 % de celle du cerveau adulte. Après la naissance, 15 % du développement du cerveau s'effectue pendant la première année et sa croissance est quasi complète à cinq ou six ans [336]. Cette croissance rapide du cerveau nécessite l'apport et la synthèse d'AGPI et plus spécifiquement l'ADH. Durant le dernier trimestre de la grossesse, environ 3 mg/jour d'ADH est concentré dans le cerveau et 5 mg/jour pendant la période d'allaitement [241, 337].

##### **❖ Pendant la gestation**

Pendant la formation du système nerveux, le fœtus éprouve un important besoin en ADH pour la formation de son cerveau [338]. Plus de 60 % de la masse du cerveau est constituée de lipides et plus de 70 % de ces lipides sont des AG  $\omega$ -3 [339] concentrés dans les membranes des neurones et des cellules de la rétine pour y assurer l'intégrité de la structure membranaire [340]. À la 26<sup>e</sup> semaine fœtale, le tissu cérébral embryonnaire incorpore au niveau membranaire  $14,5 \pm 7,3$  mg par semaine d'ADH et entre la 26<sup>e</sup> et la 33<sup>e</sup> semaine, la concentration en ADH double dans le cerveau du fœtus [341]. L'importance des N-3 au cours du développement prénatal est mieux observée lorsqu'il y a carence de ces derniers pendant la durée du développement fœtal puisqu'ils favorisent la probabilité de troubles visuels [342], de dysfonctionnement cérébral et de plusieurs troubles neurologiques, cognitifs et d'apprentissage à la naissance [343, 344].

### ❖ **Pendant la période postnatale**

Le développement postnatal représente la continuité des processus déjà amorcés avant la naissance. Chez la souris, le développement cérébral est essentiellement postnatal et la maturation des structures nerveuses qui se fait rapidement pendant les trois premières semaines de vie et s'achève au sevrage [345, 346] avant d'atteindre progressivement l'âge adulte. La différence en termes de maturation entre l'espèce humaine et animale se mesure en échelle de temps. Pendant les dernières étapes de gestation et très tôt dans la vie post-natale, l'ADH et l'AA s'accumulent rapidement dans le cerveau à travers le placenta et l'allaitement maternel ou artificiel [347, 348]. Les enfants nourris au sein présentent de meilleures aptitudes pour la résolution de problèmes et l'apprentissage du langage [349-354] et ils ont un quotient intellectuel (QI) plus élevé [355] et peuvent être plus performants [356].

#### **1.4.6.5 Liens avec le système des neurotransmetteurs**

L'ADH est concentré dans les membranes neuronales et synaptiques [357, 358] et il peut altérer la fluidité de ces membranes et de la synthèse des protéines [359-361]. Il joue un rôle critique sur le développement optimal des processus de signalisation dopaminergique et lorsque la période critique pour son développement terminée, les déficits postérieurs ne sont plus réversibles [362]. À ce sujet, les recherches ont démontrées qu'une diète carencée en N-3 peut modifier la neurotransmission de plusieurs systèmes du tonus neuro-dopaminergique et sérotoninergique [363] en altérant la concentration du cerveau en AG [357] et le tonus dopaminergique représenté par la quantification de l'expression des gènes dopaminergiques [364]. Il a également été démontré chez les rats que cette altération du circuit mésolimbique de

la dopamine aurait un effet sur les aires spécifiques au niveau du cerveau contrôlant la motivation [6, 363, 364] et la récompense alimentaire[36].

La découverte de récepteurs de la membrane plasmique liés aux AG a ouvert des perspectives intéressantes sur les effets endocriniens des AG. En effet, les AG sont également des ligands de récepteurs à sept domaines transmembranaires de la membrane plasmique de diverses cellules. Parmi eux, on distingue les récepteurs couplés à la protéine G (GPCR) GPR120 et GPR40 qui sont activés par les AG à chaîne longue tels que les AG N-3. Nous allons dans le texte qui suit parler des mécanismes d'action des AG  $\omega$ 3 via le RCPG120.

## **1.4.7 Mécanismes d'actions via le GPR120 et GPR40**

### **1.4.7.1 Les RCPGs ou GPCRs**

Les récepteurs couplés à la protéine G (GPCR) sont des structures protéiques des membranes biologiques relayant des signaux importants de la vie cellulaire. Dans ses débuts, les premiers modèles des récepteurs couplés à la protéine G portaient sur l'étude du récepteur  $\beta$ 2 adrénergique [365, 366]. Par la suite, ces récepteurs ont été liés à des maladies, où des mutations dans des gènes les codant et bloquant de nombreuses étapes de leur cycle d'activité. Compte tenu du rôle physiologique important que jouent les RCPG, certains membres de cette famille sont devenus des cibles pharmaceutiques importantes pour des pathologies aussi diverses que l'asthme, l'hypertension, les allergies ou la migraine. C'est ainsi que plus de 50 % des drogues modernes ciblent ces récepteurs [367] correspondant à plus d'un quart du top 100 des médicaments vendus à travers le monde [368].

### 1.4.7.2 Famille des RCPGs

On distingue trois différents groupes : les canaux ioniques, les récepteurs à activité enzymatique (guanylate cyclase, tyrosine kinase, sérine/thréonine kinases) et les récepteurs couplés aux protéines liant la guanosine triphosphate (récepteurs couplés à la protéine G: RCPG) auxquels nous nous intéressons. Dans le génome humain, environ 950 RCPG ont été estimé dont 500 représentent des récepteurs d'odeurs ou du goût et 450 des récepteurs de ligands endogènes [369].

### 1.4.7.3 Structure et fonctions des RCPGs

Les RCPG, représentés dans la Figure 13, possèdent un domaine central ou « corps central » commun constitué de 7 hélices alphas qui traversent la membrane plasmique et hydrophobes, d'où leur appellation courante récepteurs à sept (7) domaines transmembranaires [370].

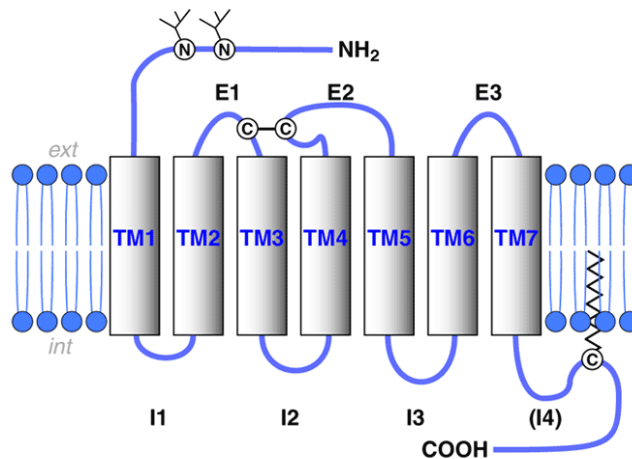


Figure 13 : Représentation schématique en deux dimensions des récepteurs couplés à la protéine G dans la membrane.

D'après Spiegel [371] schéma extrait de [www.123bio.net](http://www.123bio.net)

L'extrémité amino-terminal (NH<sub>2</sub>) est extracellulaire et est représentée avec deux sites de N-glycosylation. Les sept hélices alpha transmembranaires (I à VII) sont reliées par 3 boucles extracellulaires (E1 à E3) et 3 autres intracellulaires (I1 à I3). Un pont disulfure relie la boucle E1 à la boucle E2. L'extrémité carboxy-terminal (COOH) est intracellulaire. Cette dernière peut présenter un ancrage lipidique (palmitoylation d'une cystéine) dans la membrane ce qui crée une 4<sup>ème</sup> boucle intracellulaire, I4.

#### 1.4.7.4 Cycle de signalisation

La Figure 14 représente schématiquement les différentes étapes du cycle de la signalisation où l'agoniste se lie au site de fixation du récepteur afin d'activer la protéine G, entraînant ainsi l'échange du guanosine diphosphate (GDP) par un guanosine triphosphate (GTP) au niveau de la sous-unité  $\alpha$  (qui se sépare du dimère  $\beta\gamma$ ). Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  vont ainsi interagir avec leurs effecteurs et moduler leurs activités. L'hydrolyse du GTP met fin à l'association de la sous-unité  $\alpha$  avec son effecteur permettant de reconstituer la protéine G hétérotrimérique.

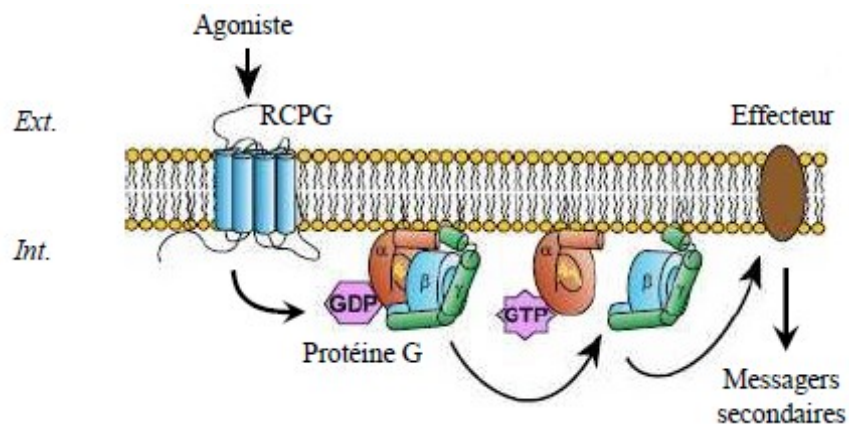


Figure 14 : Vue schématique des étapes membranaires de transduction du signal par les RCPG après activation par un ligand agoniste.

D'après Bockaert et Pin [372].

### ❖ **Activation du récepteur des RCPG par un agoniste**

Le GPR120 joue un rôle important dans la physiologie et intervient en tant que molécule de signalisation des nutriments. En pharmacologie, l'activation de RCPG et plus particulièrement de la protéine G est le plus souvent décrite par le modèle complexe ternaire qui considère l'agoniste (A), le récepteur (R) et la protéine G (G). Lorsqu'un récepteur est activé par un agoniste, il forme un complexe de faible affinité AR (agoniste-récepteur) permettant à une protéine G de s'attacher au récepteur afin de former le complexe ternaire ARG de haute affinité (ligand-récepteur-protéine G). Ce modèle décrit uniquement les interactions fondées sur l'affinité de l'agoniste considéré comme ligand (capacité à se lier au récepteur) en présumant que l'efficacité intrinsèque (capacité à activer le récepteur une fois lié) peut être traitée comme un paramètre distinct et indépendant [373, 374]. Il s'avère important de noter le mécanisme de désensibilisation du récepteur puisque dans notre protocole nous utilisons un agoniste qui stimule le RCPG120.

### ❖ **Mécanisme d'inactivation des RCPG : la désensibilisation**

La cellule est dotée d'un mécanisme de protection important contre une stimulation excessive. Dans de telles conditions physiologiques, une stimulation continue ou prolongée d'une cellule entraînera généralement une atténuation de la réponse de cette dernière afin de permettre une éventuelle stimulation par le même agoniste. Toutefois, dans des situations pathologiques, un défaut de ce mécanisme entraînera une signalisation non contrôlée et aura des effets toxiques liés à une stimulation excessive. Ce mécanisme d'inactivation des RCPG

est appelé désensibilisation [375]. Harden fut le premier à tenté d'expliquer ce mécanisme en énonçant qu'il s'agissait d'un procédé servant à enlever « désensibiliser » les récepteurs de la surface cellulaire leur permettant ainsi de s'accumuler dans des vésicules intracellulaires à faible densité [376].

### **1.4.7.5 La protéine G**

Les protéines liant la guanine ou « protéines G » sont composées de 3 sous-unités qui varient d'une cellule à l'autre [377, 378]. Il existe des récepteurs qui reconnaissent spécifiquement les AGPI-LC, ce sont le RCPG120 (GPR120) et le RCPG40 (GPR40). Dans le cadre de notre étude, nous nous attarderons plus particulièrement sur le RCPG120.

#### **❖ Le RCPG40**

En effet, GPR40 est un récepteur aux acides gras à moyenne et longue chaîne, qu'ils soient saturés ou insaturés [379, 380], que l'on retrouve principalement au niveau pancréatique jouant un rôle dans la sécrétion d'insuline [64] mais également au niveau intestinal là où il contrôle la sécrétion d'hormones gastro-intestinales telles que la CCK [66] ou le GLP-1 [65] impliquées dans la régulation de la prise alimentaire. La majorité des études effectuées sur les cellules  $\beta$  pancréatiques sont liées au GPR40 puisque son expression y est très élevée en cas d'hyperglycémie [381]. Sa présence au niveau du cerveau a été longtemps controversée, mais de récentes études semblent confirmer sa présence [67, 68] et plus précisément au niveau de la microvascularisation cérébrale de très jeunes rats [382].

## ❖ Le RCPG120

Le GPR120 se lie aux AG saturés (de C14 à C18) et aux AG insaturés (de C16 à C22) [383] plus particulièrement aux acides gras N-3 [71]. Bien qu'il fût identifié récemment, ce récepteur demeure encore peu connu. Il présente à son extrémité terminale intracellulaire une interaction avec une protéine G de la famille Gαq [383, 384] permettant l'initiation d'une signalisation cellulaire.

### 1.4.7.6 Rôles physiologiques du RCPG120

On le retrouve au niveau intestinal, dans les cellules entéroendocrines de type L de l'iléon et du colon chez la souris. Chez l'homme, il est à l'origine de sécrétion des hormones de satiété, les incrétines, le GLP-1 [385] et CCK de lipide-dépendante [72] augmentant la sécrétion de l'insuline par les cellules β [65, 386] et ralentissant la vidange gastrique chez les individus obèses [387]. Il intervient également dans la sécrétion du glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) au niveau des cellules entéroendocrines [388] chez la souris. Le GPR120 est aussi exprimé dans les cellules β pancréatique [389] et potentialise la libération du glucagon dans les cellules α présentant un effet atténué dans les cellules avec invalidation du gène GPR120 (CP Briscoe, Janssen Pharmaceuticals, communication personnelle).

GPR120 est impliqué dans l'adipogénèse en permettant la maturation et la différenciation adipocytaire [69]. Il est non seulement exprimé au niveau des poumons [390] mais également dans certaines cellules gustatives des papilles foliées, fongiformes et caliciformes des rongeurs [391-393]. Il est ainsi fortement impliqué dans les processus du goût. L'interaction GPR120 et TAB1 (protéine activatrice) représente un mécanisme d'action anti-inflammatoire utilisé par



les N-3 et sollicité dans plusieurs types cellulaires tels que les macrophages, monocytes, fibroblastes et adipocytes. Il est ainsi impliqué dans les processus anti-inflammatoires [71] et même dans les neurones de l'hypothalamus [383, 394, 395].

- **Dans le cerveau**

Bien qu'il soit exprimé au niveau des cellules neuronales de l'hypothalamus [396], le rôle joué par le GPR120 au niveau du SNC est très peu connu. Cintra et ses collaborateurs ont récemment démontré l'expression du gène codant de la protéine GPR120 au niveau des populations neuronales oréxigéniques AgRP/NPY du NAc de l'hypothalamus [77]. Un groupe de chercheurs a récemment identifié un transporteur auparavant orphelin. Ce membre de la super famille des facilitateurs majeurs, le Mfsd2a (Major facilitator superfamily domain-containing protein 2 a) est une protéine qui s'avère être exprimée exclusivement dans l'endothélium des micro-vaisseaux sanguins formant la BHE et étant le principal transporteur pour l'ADH dans le cerveau [397]. Des analyses lipidomiques indiquent que les souris dont le gène codant pour le Mfsd2a a été invalidé (Mfsd2a déficientes) illustrent des niveaux d'ADH nettement réduits dans le cerveau accompagné d'une perte de l'activité des cellules neuronales dans l'hippocampe et le cervelet ainsi que des troubles cognitifs et d'anxiété sévère [397].

Une étude récente a découvert un polymorphisme de GPR120 humain présent dans les populations européennes. Le R270H possède la capacité d'inhiber la signalisation intracellulaire médiée par les AG à chaîne longue en augmentant le risque d'obésité chez les souris et chez l'homme [70]. Les souris déficientes en GPR120 ont une réduction de leur métabolisme basal, une augmentation de la résistance à l'insuline et à l'expression des gènes

pro-inflammatoires favorisant la prise de poids lorsqu'elles sont exposées à une diète riche en gras [70, 71].

GPR120 et GPR40 sont doté de pouvoir thérapeutique pour le diabète du type 2 puisque des études cliniques plaident en faveur de l'agoniste du GPR40, le TAK-875 comme étant élément déterminant pour l'amélioration du contrôle de la glycémie chez les patients Japonais atteints du diabète de type 2 [398]. L'activation du GPR120 par des agonistes spécifiques, stimule la libération des incrélines tel que le GLP-1 [63] et le CCK [72]. De plus, connaissant les conséquences de l'état inflammatoire sur le diabète du type 2, l'activation du GPR120 possède un effet anti-inflammatoire [71].

À ce jour, la lutte pour le traitement de l'obésité est décevante puisque les stratégies de changement de mode de vie et d'interventions pharmacologiques n'ont abouti qu'à des résultats limités sur la perte de poids. Toutes ces démarches aboutissent à une perte de poids aussi modeste qu'elles soient, mais problème à la base demeure entier en ce qui concerne le maintien de cette perte de poids?

## **Chapitre 2 : Objectifs et approches expérimentales**

## ***2.1. Origine du projet***

Jusqu'à maintenant, un ensemble de données cohérentes stipule que les AGPI N-3 jouent un rôle important dans les fonctions émotionnelles et cognitives ainsi que dans les comportements de consommation alimentaire. Ces AG N-3 proviennent exclusivement de l'alimentation. Parmi eux, l'ADH est un composant majeur des structures membranaires phospholipides du cerveau, se retrouvant à un niveau de concentration élevée dans le cerveau de babouins [399], de rats [400] et de souris [401]. Il régule la fluidité de la membrane et la transduction des signaux.[317] IL a été rapporté que la supplémentation en ADH améliore les processus cognitifs et émotionnels [335, 402, 403] et affecte la neurotransmission et la plasticité synaptique, tout en présentant des propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices [404-406]. En revanche, un déficit alimentaire en N-3 à long terme réduit la teneur du cerveau en ADH et provoque l'anxiété [407, 408], des troubles d'apprentissage [408, 409], la neuroinflammation [410, 411] ainsi que des altérations de l'activité locomotrice [412, 413]. Les régimes à haute teneur en matières grasses en particulier de gras saturés, est une caractéristique du régime occidental qui peuvent induire une baisse du taux de N-3 ou une augmentation du ratio N-6:N-3 en raison de la faible teneur en N-3 [414]. Des données récentes suggèrent que la carence maternelle alimentaire en AG N-3 pendant la gestation et la période périnatale augmente la signalisation de l'appétit chez les descendants [415] ce qui favorise l'apparition de surpoids et d'obésité.

Bien que des études physiologiques et mécanistiques ont démonté les actions centrales de l'ADH au niveau central, des questions persistent toujours sur les fonctions spécifiques des récepteurs de ces AG. L'ADH se lie et active le GPR120 (aussi connu sous le nom de

récepteur de l'AGPI N-3), un récepteur couple aux protéines G qui joue un rôle important dans les effets anti-inflammatoire et de sensibilité à l'insuline en périphérie [70, 71, 416]. Les données préliminaires de notre laboratoire montre une haute expression de l'ARNm du GPR120 dans différentes régions du cerveau en particulier le NAc et l'hypothalamus. Une étude récente a fortement suggéré que le GPR120 pourrait médier les effets anti-inflammatoire des AGPI N-3 dans l'hypothalamus durant l'exposition à une diète obésogène [77].

Ainsi, il nous a paru donc nécessaire de chercher à comprendre d'une part, comment la carence alimentaire en AGPI N-3 chez la mère durant la période périnatale influence la balance énergétique et l'état émotionnel chez la progéniture. D'autre part de vérifier l'effet d'une stimulation pharmacologique aiguë et chronique au niveau central des récepteurs de ces AG sur l'homéostasie et l'état émotionnel.

## **2.2. Objectifs généraux et hypothèses**

Cette étude vise à déterminer dans quelle mesure l'apport déficitaire comparativement à l'apport adéquat en ADH pendant la grossesse et ce jusqu'au sevrage (période périnatale).

- influence la prise alimentaire et en particulier les effets de récompense et de motivation alimentaire chez la progéniture mâle suite à des modifications des niveaux plasmatiques et biochimiques en ADH dans le cerveau;
- modifie la composition corporelle, les dépenses énergétiques, les troubles métaboliques et neurologiques de type anxieux et dépressif chez la progéniture mâle.

La documentation sur le sujet nous a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle l'exposition durant la période de conception au sevrage (période périnatale) à un régime

déficitaire en AGPI N-3, et en particulier l'ADH, altérerait la composition en AG dans le cerveau en contribuant à l'augmentation des signaux de la motivation alimentaire soit par l'effort déployé pour obtenir un aliment savoureux ou palatable, chez la progéniture. Conséquemment, surviendront des altérations sur les comportements de type anxieux et dépressif, les dépenses énergétiques chez la progéniture à l'âge adulte, une fois exposée à une diète obésogène, riche en gras et en sucre.

Nous avons voulu par la suite évaluer l'effet de la stimulation pharmacologique aigüe et chronique d'un agoniste spécifique du GPR120 (GPR120 III) sur le SNC chez la souris et vérifier dans quelle mesure cette stimulation pourrait engendrer des modifications sur :

- la prise alimentaire et plus particulièrement la motivation alimentaire et les variations dans le bilan énergétique;
- le comportement émotionnel de type anxieux lorsque les souris sont exposées à une diète obésogène.

Nous avons émis l'hypothèse qu'une stimulation aigüe des récepteurs du GPR120 par un agoniste spécifique au niveau du SNC réduirait la consommation alimentaire et par conséquent la prise de poids et le comportement émotionnel de type anxieux. L'ensemble des données obtenues lors de la stimulation aigüe nous a amené à émettre l'hypothèse selon laquelle l'administration chronique de l'agoniste du GPR120 pendant deux semaines pourrait exacerber les effets de réduction de l'apport alimentaire et le poids corporel. Conséquemment, les dépenses énergétiques de même que l'état émotionnel de type anxieux que ce soit sous une diète régulière ou une diète obésogène chez la souris seraient altérés.

## **2.3. Méthodologie**

Dans ce chapitre nous aborderons l'origine du projet en précisant nos objectifs généraux et l'énoncé des hypothèses qui en découlent. Le déroulement des différentes procédures expérimentales sera décrit de manière chronologique afin d'expliquer le projet de thèse dans son intégralité de même que les différentes techniques utilisées dans nos expériences exploratoires de motivation alimentaire, de l'homéostasie énergétique et de l'état émotionnel de l'anxiété et la dépression.

### **2.3.1. Description du projet**

Dans le but de mieux comprendre le rôle de la diète des AGPI N-3, sur l'organisme, plusieurs études ont été réalisées durant ces dernières années. Les premières données mettant en relation les AG non saturés et la fonction cérébrale proviennent d'études effectuées auprès d'animaux ayant été privés ou non en suppléments de classe spécifique d'AG.

Afin de valider nos hypothèses, deux approches expérimentales ont été utilisées. Nous avons observé par une approche *in vivo*, les effets d'une diète déficitaire en N-3 pendant la période périnatale sur la balance énergétique, la motivation alimentaire et l'état émotionnel de type anxieux et dépressif. Nous appuyant sur notre hypothèse, nous nous sommes ensuite intéressées toujours *in vivo* à la stimulation centrale des récepteurs spécifiques liés aux AGPI-LC et en particulier ceux des N-3 au niveau du système nerveux. Le but de cette expérience était d'évaluer l'effet de cette stimulation centrale sur la balance énergétique, la motivation alimentaire et l'état émotionnel de type anxieux chez les souris C57Bl6. Dans le but d'offrir une meilleure compréhension du déroulement de chacune de ces études, nous allons détailler

la méthodologie adoptée pour chacune des expériences en commençant par l'approche systémique par manipulation de la diète. Nous nous sommes par la suite attardées à l'approche par stimulation centrale.

#### **2.3.1.1. Approche systémique**

Cette partie de la recherche vise à fournir à une meilleure compréhension des effets de la carence alimentaire en AG N-3 pendant la période périnatale sur le bilan énergétique, la motivation alimentaire, les troubles neurologiques de type anxieux et dépressif chez la progéniture des souris mâles C57Bl6 soumis à une diète régulière ou obésogène.

L'approche systémique par manipulation de la diète a été menée sur un modèle animal d'exposition des mères (souris adulte âgée de 7-8 semaines) soumises à une diète équilibrée ou déficitaire en AGPI N-3 durant la période périnatale [417]. Ce qui est apparu évident dès le début de la mise au point du protocole de l'étude était que l'utilisation d'une diète préfabriquée composée de nutriments correspondait davantage à la concentration dans la vraie des nutriments retrouvés dans une diète humaine. Ceci répondrait mieux aux attentes actuelles dans le domaine nutritionnel. Un tel modèle de régime occidental, riche en LA mais pauvre en ALA, EPA et DHA se traduit par un ratio N-6/N-3 très déséquilibré [418]. La figure 15 présente le schéma d'une échelle de temps correspondant au déroulement et à la procédure de l'expérience.



## PROCEDURE

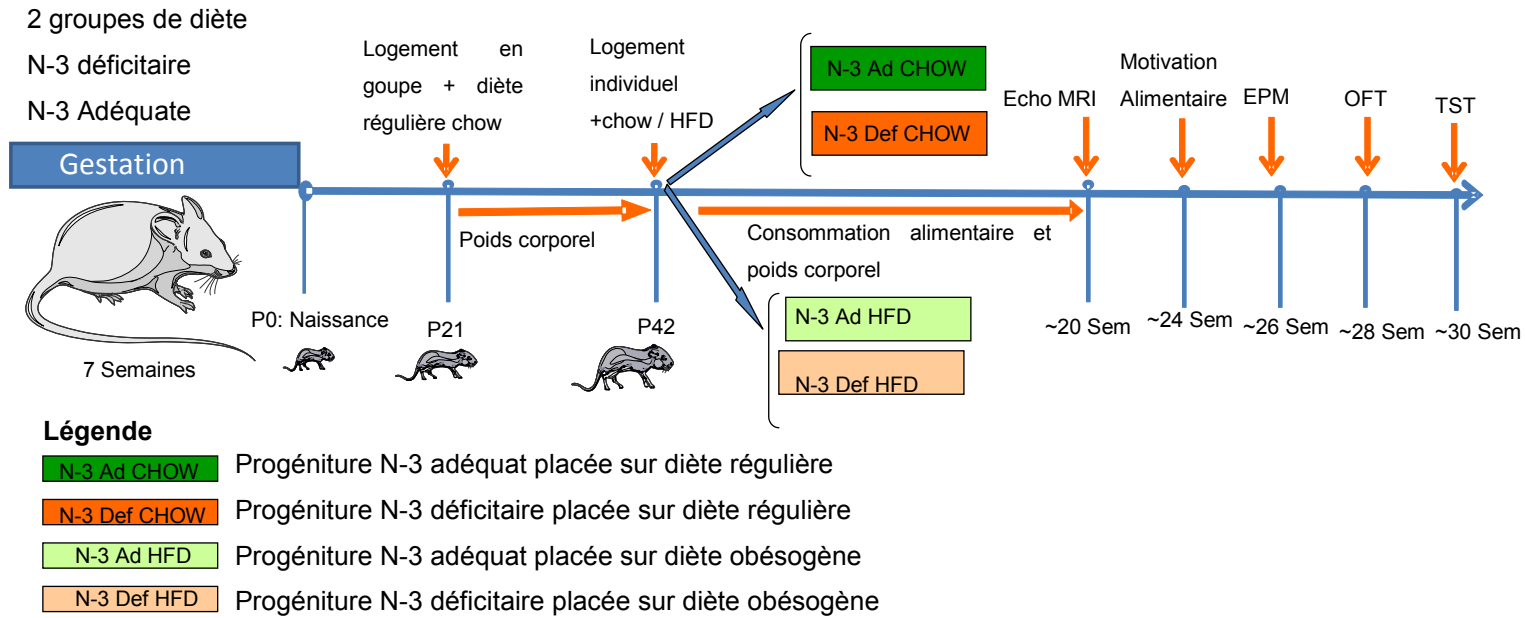


Figure 15 : Représentation schématique sur une échelle de temps du déroulement des expériences de l'approche systémique

N-3 adéquat : Diète contenant une quantité adéquate en N-3 et N-3 déficitaire : Diète déficitaire en N-3

P0 : Jour de la naissance, J0 post-natal. P21 : J21 post-natal, jour du sevrage. P42 : J42 post-natal, considéré comme âge adulte

EchoMRI : Échographie par résonance magnétique réalisée à environ 20 semaines d'âge

Motivation alimentaire : Test réalisé à environ 24 semaines d'âge

EPM : Test Elevated plus maze ou labyrinthe en croix surélevé (LCS) réalisé à environ 26 semaines d'âge

OFT : Test Open field ou test à champ ouvert réalisé à environ 28 semaines d'âge

TST : Tail suspension test ou test de suspension caudale réalisé à environ 30 semaines d'âge

Des souris naïves âgées de 7 semaines en gestation après accouplement, ont été placées aléatoirement en choisissant les souris de manière alternée l'une à la suite de l'autre pour les placer soit sous une diète adéquate ou sous une diète déficitaire en AGPI N-3. Nous avons par la suite vérifié la répartition des valeurs de base (comme par exemple le poids) entre les deux groupes. Les mères et leurs progénitures ont été gardées sous une diète (adéquate ou déficitaire en AGPI N-3) durant toute la gestation et jusqu'au sevrage. Nous avons pour l'étude utilisé des souris mâles (N= 32 progénitures mâles) qui ont reçu depuis leur conception jusqu'au sevrage, un régime dépourvu d'AGPI-LC N-3. Compte tenu du métabolisme des AGPI, ce régime était également dépourvu d'ALA afin de limiter la production de dérivés à longue chaîne. Les animaux du groupe contrôle (N= 24 progénitures mâles) ont quant à eux reçu une diète adéquate en AGPI-LC N-3 durant la même période périnatale. Après 3 semaines de vie (SA) ou 21 jours après la naissance (P21), les 2 groupes de progéniture sevrés ont reçu une diète « standard » régulière et ont été placés en groupes respectifs mais dans les mêmes cages jusqu'à l'âge adulte (P42). Pendant cette période, le contrôle du poids corporel fut effectué à tous les 2 jours.

Après 42 jours post-natal (P42 soit l'âge adulte) afin de mesurer leur poids corporel et leur consommation alimentaire individuelle, chaque souris fut logée dans une cage individuelle et tous les 2 jours, des mesures furent prises à heure fixe de la journée (avant 10:00, heure de début du cycle inversé) par la même personne avec les mêmes instruments (balance électronique et récipient métallique) jusqu'à environ 150 jours post-natal (environ 22 semaines). À compter de P42, quatre (4) groupes ont été formés au sein de la progéniture mâle: les souris issues de mères ayant eu une diète adéquate en N-3 durant la gestation et placées sous régulière standard chow (progéniture N-3Ad Chow; 18 mâles), les souris issues

de mères ayant eu une diète adéquate en N-3 mais placées sous diète obésogène, high-fat diet (HFD) (progéniture N-3Ad HFD; 5 mâles), les souris issues de mères ayant eu une diète déficitaire en N-3 et maintenues sous une diète régulière standard chow (progéniture N-3Def Chow; 13 mâles) et finalement le dernier groupe, les souris issues de mères déficitaires en N-3 et placées sous diète obésogène riche en gras et en sucre, HFD (progéniture N-3Def HFD; 9 mâles). Par la suite, tous les tests métaboliques et comportementaux ont été réalisés à différentes période de l'âge adulte. De manière chronologique, nous avons d'abord déterminé la composition corporelle des souris âgées d'environ 20 semaines en les plaçant dans un appareil d'imagerie par Echo-résonance magnétique (*Echo-MRI*) afin de relever le pourcentage d'eau, de masse maigre et de masse grasse. Le comportement de motivation alimentaire a été observé vers 24 semaines d'âge et ce, uniquement sur la progéniture placée sur diète régulière standard chow puisque la récompense alimentaire utilisée afin d'évaluer la motivation alimentaire est composée de sucrose et n'aurait pas eu l'effet palatable recherché sur la progéniture ayant reçu la diète HFD. Le comportement émotionnel de type anxieux des souris a été évalué à partir des tests *Elevated Plus Maze* (EPM) et *Open Field Test* (OFT) vers respectivement 26 et 28 semaines d'âge. Le test pour évaluer le comportement de type dépressif a été réalisé grâce au test de suspension caudale ou *Tail suspension test* (TST) à 30 semaines d'âge environ. Parallèlement, les dosages des acides gras pour déterminer le profil lipidique ont été réalisés sur le cerveau de 10 jeunes souris femelles (5 adéquats/5 déficitaires) au stade P21.

Afin d'avoir une idée de l'âge des souris comparé à celui de l'humain, nous pouvons considérer J42 soit 1½ mois chez la souris à celui d'un jeune adulte. À cet âge, la souris est mature sexuellement et est en âge de se reproduire. Pour être plus précis, selon le site:

<http://www.age-humain.com/calcul-age-souris.html> il n'y a pas de formule de calcul infaillible pour calculer l'âge d'une souris puisque sa croissance et son évolution physiologique au cours de sa vie sont très différents de ce que l'on observe chez l'humain. Néanmoins, c'est plutôt à partir des observations réalisées à différents âges de la souris, que des vétérinaires ont établi une certaine correspondance pour visualiser un équivalent en âge humain. L'âge réel d'une souris soit 1 mois, 2 mois, 4 mois, 6 mois, 8 mois, 10 mois, 1 an, 2 ans, 3 ans; correspond respectivement à l'âge humain à 14 ans, 20 ans, 26 ans, 34 ans, 42 ans, 50 ans, 58 ans, 70 ans, 100 ans. De ce fait, dans notre étude 24 semaines (6 mois) = 34 ans en âge humain; 26 semaines (6½ mois) = environ 36 ans en âge humain; 28 semaines (7 mois) = environ 38 ans en âge humain et 30 semaines (7½ mois) = environ 40 ans en âge humain.

De Charles Rivers, nous avons commandé 12 souris mâles polygames C57Bl6 à des fins d'accouplement qui furent distribués aléatoirement de manière alternée avec 6 mâles sous une diète déficitaire en N-3 et 6 mâles sous une diète adéquate en N-3. Accompagnées de ces 12 souris mâles, nous avons également commandé 24 souris femelles naïves C57Bl6 réparties aléatoirement de manière alternée en 12 femelles sous une diète déficitaire en N-3 et 12 femelles sous une diète adéquate en N-3. Le jour de l'accouplement, 1 mâle fut placé dans une cage avec 2 femelles (ratio 1 :2) et ils ont reçu tous la même diète (soit adéquate ou déficitaire en N-3). De ces accouplements, nous avons obtenu 32 progénitures mâles sous diète déficitaire en N-3 et 24 progénitures mâles sous diète adéquate en N-3. Les difficultés rencontrées furent nombreuses en commençant par le faible taux de succès au niveau de la reproduction

- En règle général, le taux de reproduction chez la souris C57Bl6 est relativement faible. Selon le laboratoire Charles River il est d'environ 25 %, et peut-être moindre dans le cas de « gestation chronométrée ». Pendant nos manipulations, nous avons pu atteindre un taux de succès de reproduction d'environ 30 % (en considérant les 24 femelles obtenues pour l'accouplement et l'élevage, seulement 7 souris gestantes ont mis bas). Les souris femelles non gestantes n'étaient plus utiles pour ce protocole puisqu'il nous fallait des femelles naïves primigestes et non soumises à une diète soit adéquate ou déficitaire en N-3.

- Le faible ratio de petits mâles par portée. Le nombre total de mâles par portée pour la majorité était au nombre de 6. Dans un groupe nous avons eu seulement 2 petits mâles, soit un nombre insuffisant pour obtenir un groupe expérimental. Compte tenu que nous n'avions pas utilisé la progéniture femelle dans ce protocole, nous en avons utilisé quelques unes afin d'évaluer le profil lipidique des acides gras totaux dans le cerveau et les autres femelles ont été offertes gracieusement à d'autres laboratoires.

- Pour des raisons hors de notre contrôle (probablement le stress) nous avons eu des cas de canibalisme dont au moins 3 portées de taille d'environ 5 à 8 qui ont été entièrement dévorées par leur mère.

- Pour des raisons inexplicables, nous avons eu mystérieusement 4 jeunes petits mâles provenant d'une litière de 8 qui sont décédés après le sevrage. L'autopsie de ces animaux n'a révélée aucune anomalies des dents, de la taille de la tête pouvant révéler une hydrocéphalie ou de l'appareil respiratoire ou digestif.

### **Composition des différentes diètes : adéquate et déficitaire en oméga-3**

Lors de nos expériences nous avons utilisé une diète contenant un mélange des nutriments dans des proportions respectant ou correspondant aux quantités ingérées chaque jour par l'homme. Rien n'indique ici qu'un régime déficitaire en N-3 utilisé ne développe des problèmes de santé pendant le temps qu'il est utilisé [419]. Certains paramètres physiques ont été examinés chez la souris en y incluant la peau, les poils, les yeux, le nez, la cavité buccale et l'abdomen afin de détecter la présence de masses et y effectuer la mesure de la masse corporelle. Aucune différence n'a été observée sur ces signes physiques et ce, entre les deux types de régime. Les diètes ont toutes été fabriquées sur mesure par Dyets inc. (CP 3485 2508 Easton Avenue Bethlehem, Pennsylvanie 18017). La nourriture était scellée sous vide sous atmosphère d'azote et conservées à 4°C jusqu'à ce qu'elle soit administrée aux animaux à température ambiante.

Les diètes contiennent des quantités identiques de protéines, de glucides, de macronutriments, de vitamines, de minéraux. Il existe toutefois une légère différence dans les graisses de base. La diète déficitaire contient soit une quantité supérieure d'huile de noix de coco hydrogénée et d'huile de carthame (N-3 déficitaire) comparativement à la diète adéquate (N-3 adéquate). Il existe 2 types d'huile de carthame, l'une étant composée d'acide oléique (acide gras monoinsaturé) et l'autre d'acide linoléique (polyinsaturés). Nous avons utilisée celle à base d'acide oléique. L'huile de coco hydrogénée est composée d'AGS à 91 %, d'AGMI de l'ordre de 6 % et d'un mélange d'AGPI (acide linoléique N-3, 0 %; acide linoléique N-6, 2 %; acide oléique N-9, 6 %). La principale différence est l'absence totale d'huile de lin et d'ADH dans la diète N-3 de type déficitaire comparativement à la diète N-3

dite adéquate contenant respectivement 4,81g/kg et 3g/kg. Ces deux diètes sont isocaloriques 1000 cal/100g de diète. Les différents ingrédients contenus dans les 2 types de diètes sont détaillés dans le tableau 2 ci-dessous.

<b>Ingrédients</b>	<b>N-3 Adéquate (g/kg)</b>	<b>N-3 Déficitaire (g/kg)</b>
Vit. (No Caséine)	200	200
L-cystine	3	3
Maïzena	150	150
Sucrose	100	100
Dextrose	199.48	199.48
Maltose Dextrine	150	150
Cellulose	50	50
Huile de Carthame	17.7	19
Huile de noix coco	75	81
<b>ADH</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
TBHQ	0.02	0.02
Vitamines	10	10
Choline Bitartrate	2.5	2.5
<b>Huile de Lin</b>	<b>4.81</b>	<b>0</b>
Minéraux	35	35
<b>Total</b>	<b>1000.00</b>	<b>1000.00</b>

Tableau 2: Différents ingrédients composent les diètes adéquate et déficitaire en N-3.

### 2.3.1.2. Approche centrale

Dans cette seconde partie de la recherche, les effets de la stimulation pharmacologique du récepteur des AGPI-LC, le GPR120, au niveau du SNC, ont été évalués sur la balance énergétique, l'alimentation, l'état émotionnel et le type d'anxiété obtenu chez des souris une

fois soumises à une diète régulière ou obésogène. Les résultats obtenus nous ont procuré de nouvelles données sur l'action anxiolytique et catabolique de la stimulation cérébrale des récepteurs GPR120.

Nous avons émis l'hypothèse qu'une activation pharmacologique aiguë ou chronique de GPR120 dans le SNC aurait des effets cataboliques et des actions anti-anxiété. Cette approche de stimulation centrale a été menée sur un modèle de rongeur soit des souris âgées entre 9-10 semaines pour les expériences de stimulation aiguë; et entre 11-12 semaines pour la stimulation chronique. Il est bien établi que les AGL sont non seulement des substances nutritives essentielles mais qu'ils agissent comme des molécules de signalisation dans le cerveau [420] et que leurs récepteurs jouent un rôle important dans le contrôle du métabolisme et de l'énergie [421]. Parmi ces récepteurs, le GPR120 est connu en tant que récepteur d'acide gras N-3 possédant une activité anti-inflammatoire et insulino-sensibilisante [422]. Dès le début de la mise au point du protocole de cette étude, il nous est apparu évident de convenir de la dose idéale et physiologique à administrer à nos souris afin de pouvoir en évaluer les effets. Nous nous sommes basé sur une étude récente qui a démontré que l'injection intracérébroventriculaire (ICV) d'un agoniste similaire mais moins sélectif au GPR120 et au GRP40 [423] à une concentration de 0,1 et 1,0  $\mu$ M (micromolaire) par souris, réduit considérablement la douleur induite par la formaline [424]. Velloso et ses collaborateurs ont pour leur part démontré que l'injection en ICV d'AG purs N-3 et N-9 réduit considérablement l'apport alimentaire et le gain de poids chez des rats obèses. À cet effet, il semblerait que cette injection hypothalamique des AG purs activerait la signalisation par l'intermédiaire du GPR120 [77]. Malgré ces observations, on ne sait toujours pas si l'activation de GPR120 centrale affecte l'équilibre énergétique, la motivation alimentaire et l'état émotionnel de type



anxieux. La figure 15 représente un schéma selon une échelle de temps correspondant au déroulement de la stimulation aiguë centrale pharmacologique et la figure 16 représente un schéma selon une échelle de temps correspondant au déroulement de la stimulation chronique centrale pharmacologique.

### ❖ Stimulation aiguë

#### Procédure

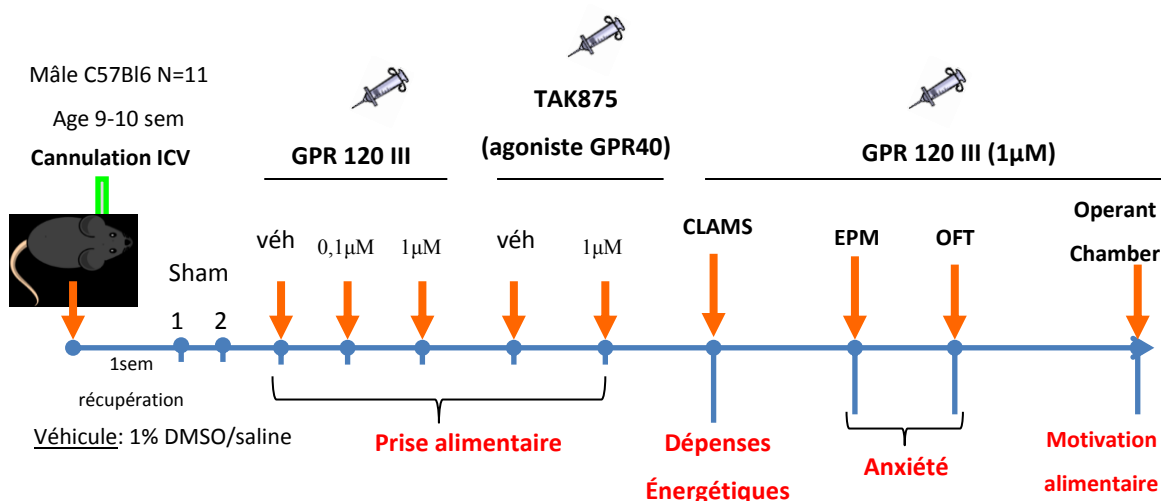


Figure 16 : Représentation schématique du déroulement des expériences pendant la stimulation centrale pharmacologique aiguë.

Sham 1 et 2 : séance de manipulation d'accoutumance durant 2 jours.

Nous avons utilisé des souris adultes C57Bl6 N=11 mâles âgés entre 9 et 10 semaines (commandées par Charles River, St Constant, Canada, âgées entre 7-8 semaines). Les souris ont subi une période d'acclimatation pendant une semaine pour ensuite être anesthésiées avec de l'isoflurane. Nous avons pratiqué une chirurgie stéréotaxique pour l'implantation d'une canule au niveau du cerveau et plus précisément au niveau du ventricule latéral afin de leur administrer pharmacologiquement un agoniste spécifique pouvant stimuler les récepteurs liés aux AGPI-LC. Environ 5 jours après l'intervention, la bonne position de la

canule dans le ventricule latéral a été vérifiée par l'injection de 1  $\mu$ l d'Angiotensine II (AgII, 10 mg i.c.v.) visant à stimuler immédiatement le réflexe de la soif chez la souris. Nous avons octroyé une (1) semaine de récupération aux souris afin qu'elles puissent reprendre leur poids initial avant la chirurgie et récupérer adéquatement leur rythme de prise alimentaire et de mobilisation. À l'intérieur d'une semaine la reprise du poids initial a été vérifiée pour chacune des souris (data non montré). En effet, 48 à 72 heures après l'intervention chirurgicale représentent la fourchette de temps généralement requise pour avoir un retour à la normale du poids. Au-delà d'une semaine, s'il n'y a pas de reprise de poids, cela témoigne d'une atteinte neurologique probable. Nous avons par la suite fait des séances d'accoutumance à la manipulation (sham) pendant deux (2) jours en introduisant l'injecteur à travers la canule de sorte que la souris ne soit pas stressée la journée de l'expérience. La souris fut ainsi maintenue immobile manuellement tout en lui enlevant délicatement la canule mannequin afin d'y introduire la canule d'injection.

La mesure de la prise alimentaire a été faite avec l'agoniste GPR120 (GPR120 III, faible dose et forte dose) et l'agoniste GPR40 (TAK-875). Les différentes injections se sont faites successivement mais à intervalles différentes. Le premier jour (1<sup>er</sup> jour), nous avons procédé à l'injection de 1 $\mu$ l avec le véhicule (DMSO 1 % + saline) puis deux jours plus tard soit le troisième jour (3<sup>ème</sup> jour), l'injection de la faible concentration 0,1  $\mu$ M dans une solution de 1  $\mu$ L en terminant avec la concentration maximale de 1  $\mu$ M d'une solution de 1  $\mu$ L de l'agoniste GPR120 III le cinquième jour (5<sup>ème</sup> jour). Trois jours plus tard, ces mêmes souris ont été injectées avec le véhicule puis deux (2) jours plus tard avec 1  $\mu$ M de l'agoniste du GPR40, le TAK-875. Les tests de calorimétrie indirecte, d'anxiété et de motivation alimentaire ont été réalisés afin d'évaluer l'effet du GPR120 III à forte dose (1 $\mu$ M). À la fin de

l'expérience, les souris furent euthanasiées. Les injections ont été administrées durant 5 minutes à travers un injecteur introduit dans la canule implantée et adapté par un drain à une neuro-seringue d'Hamilton de 1µl et de calibre 27. Nous avons utilisé l'agoniste GPR120 III, le plus récemment développé et commercialisé par Calbiochem Millipore (San Diego, CA) dilué dans une solution stérile de solvant organique, DMSO à 1 %. Cet agoniste est représenté par la formule suivante : 3-(4-((4-Fluoro-4'-methyl-[1,1'-biphenyl]-2-yl) methoxy) phenyl)-propanoic Acid. Bien que GPR120 et GPR40 soient biochimiquement éloignés, il existe une étroite ressemblance structurelle entre les ligands pouvant reconnaître et activer les deux récepteurs. Afin de déterminer l'effet réel du GPR120 sur la prise alimentaire, il est important de séparer la stimulation du GPR40 au niveau du SNC de celui du GPR120. Pour ce faire, nous avons utilisé la molécule TAK-875, un agoniste spécifique des récepteurs GPR40, caractérisée par Negoro et ses collaborateurs [425]. Cet agoniste, le fasiglifam (TAK-875), de formule chimique [(3S)-6-((20,60-dimethyl-40-[3-(methylsulfonyl)propoxy]biphenyl-3-yl)methoxy)-2,3-dihydro-1-benzofuran-3-yl]acetic acid hemi-hydrate) (TAK- 875, Selleckchem, TX, USA) [425] est à notre connaissance le traitement clinique du DT2 le plus avancé [398]. Il est également un agoniste du récepteur GPR120 malgré son efficacité inférieure à celle des acides gras à longues chaînes. Nous avons dilué le TAK-875 dans du DMSO 1 % puis dans du salin, dans lequel il se solubilise parfaitement.

## ❖ Stimulation chronique

### Procédure

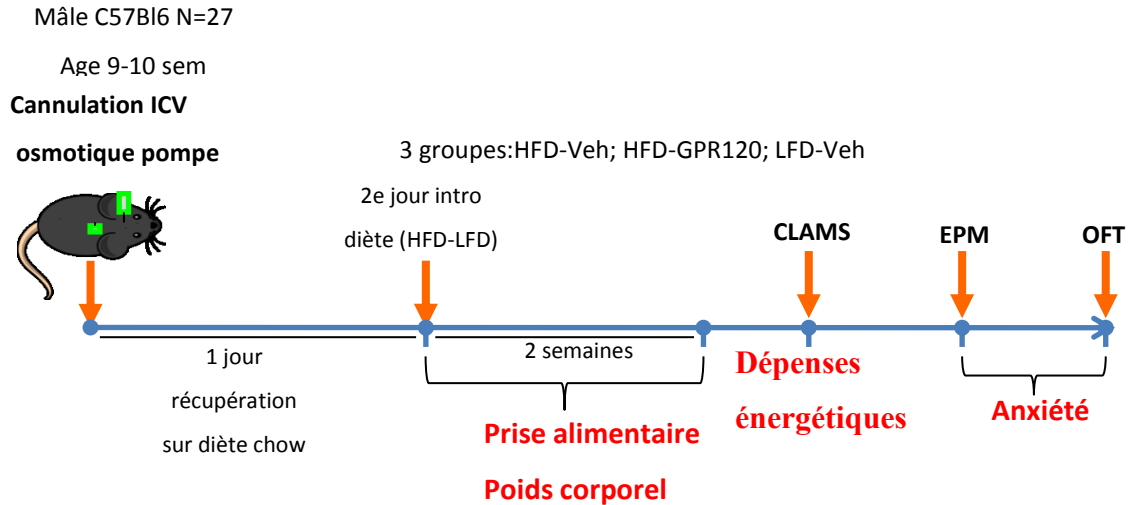


Figure 17 : Représentation schématique du déroulement des expérimentations pendant la stimulation centrale pharmacologique chronique à l'aide d'une pompe osmotique.

Des souris mâles C57BL/6 (N=27) âgés de 9-10 semaines ont été anesthésiées avec de l'isoflurane et placées dans un appareil de stéréotaxie. Nous avons implantées des canules dans le ventricule latéral du cerveau en les connectant à une pompe osmotique fonctionnelle pendant 21 jours, contenant soit le véhicule (DMSO 1 % dilué dans du salin) ou l'agoniste GPR120 (GPR120 III, forte dose  $1\mu\text{M}$ ). Après l'implantation de la canule, les souris sont demeurées dans des cages individuelles sous diète régulière et de l'eau *ad libitum* pendant 24 heures afin qu'elles puissent récupérer suite à l'intervention chirurgicale. Le jour suivant l'intervention, la nouvelle diète a été introduite afin de créer 3 groupes soit HFD-Veh : les souris placées sous diète hypercalorique (HFD) avec pompe osmotique contenant le véhicule; HFD-GPR120: les souris placées sous HFD avec pompe osmotique contenant l'agoniste et LFD-Veh : les souris placées sous diète hypocalorique (LFD) avec pompe osmotique contenant le véhicule. Pendant 2 semaines la prise de poids et la consommation alimentaire

furent contrôlées. Par la suite, les souris ont séjourné dans le «Comprehensive Lab Animal Monitoring System» (CLAMS) durant 3 jours (deux (2) jours d'adaptation et une (1) journée de collecte des données) afin d'évaluer les dépenses énergétiques. À leur sortie du CLAMS et après séjourné 24 heures dans leur cage respective, nous avons dans un premier temps évalué le comportement de type anxieux avec l'EPM et le jour suivant avec l'OFT. À la fin de cette expérience, les souris ont été euthanasiées.

### **- Description de la procédure chirurgicale**

La souris anesthésiée avec de l'isoflurane est préparée selon les procédures chirurgicales de stérilisation et d'asepsie avant d'être immobilisée et placée dans un cadre stéréotaxique (Kopf Instruments). Une incision sagittale médiane d'environ 2 cm est effectuée sur la peau au niveau de la tête afin de visualiser les points de repère du crâne : bregma et lambda. Lorsque la position du crâne à plat est confirmée, les coordonnées de placement de la canule sont calculées. À l'aide d'une perceuse électrique, une perforation du crâne au site exact de l'emplacement de la canule est exécutée. La pointe de la canule guide stérile est introduite et située dans le ventricule latéral. Cette canule de guidage est ancrée au crâne par un ciment (Cerabond) et une colle spéciale en gel de cyanoacrylate (Cranioplastic) de Plastics One pour ensuite être fermée par une canule mannequin pour les expériences de stimulation aiguë.

### **- Site d'injection aiguë et chronique**

Le site d'injection intracérébroventriculaire (ICV) de l'agoniste et du véhicule s'effectue au niveau du ventricule latéral du cerveau par une chirurgie stéréotaxique. Les

coordonnées utilisées sont calculées à partir du repère anatomique du crâne, le bregma (caudale de +0,5 mm et +1,0 mm latéralement et -2,0 mm ventral) à partir de la surface du crâne.

### **2.3.1.3. Matériel de canulation**

Tout le matériel de canulation nous provient d'une compagnie (Plastics One, Roanoke, VA).

#### **-Pour l'injection aiguë**

Nous avons introduit dans le cerveau des canules de guidage (C315GS-5-SP) constituées d'un tube hypodermique en acier inoxydable, d'une longueur 5mm en dessous de la base et de calibre 26 surmonté d'un plastique. La canule d'injection (C315IS-5-SPC) est de calibre 33 et s'adapte à la canule de guidage de sorte qu'elle puisse aisément y pénétrer. Elle possède une longueur de 5mm (dépassé la canule de guidage de 1mm) et sert à l'injection de la substance à travers la canule de guidage. La canule mannequin (Dummy canula ou Dust Cap, C315DCS-5-SPC) mesure 4mm et possède un calibre 33. Elle se visse fermement contre la canule de guidage de sorte que l'animal soit moins susceptible de la dévisser pendant le toilettage et elle empêche les risques d'infections, d'évacuation du liquide céphalo-rachidien tout en évitant que la canule de guidage se bloque.

#### **- Pour l'injection chronique**

Pour l'administration chronique, une canule spéciale (ALZET Brain Infusion Kit 2, Order number: 0008663, 28 gauge, 3-5 mm from skull surface) a été implantée par stéréotaxie dans le ventricule latéral des souris et fut connectée à une pompe osmotique à l'aide d'un

cathéter polyéthylène (PE 60) de diamètre intérieur : 0.76 mm, longueur : 3 cm. La pompe sera à son tour adapté à la canule implantée dans le cerveau pour atteindre plus précisément le site d'injection.

Les pompes osmotiques ALZET® sont miniatures et implantables. Elles libèrent à débit constant des agents à évaluer chez les modèles de recherche. Elles peuvent être implantées en sous-cutané ou dans la cavité péritonéale. Dans notre protocole, nous avons utilisé le modèle de pompes (1002) en les positionnant entre les omoplates en sous-cutané de telle sorte qu'elles délivrent la drogue de manière automatique, continue et à débit constant de 0,25 µl/h, pendant une durée maximale d'injection de la drogue de 21 jours. Cette pratique moins contraignante remplace les injections répétées et limite le stress des animaux provoqué par des manipulations répétitives nécessaires lors d'injections périodiques. Ces pompes osmotiques offrent également une grande fiabilité de l'administration "in vivo" en maintenant des taux constants de l'agent administré et des concentrations efficaces de courte demi-vie dans le plasma et les tissus. Elles permettent d'en étudier les effets de manière globale et reproductible. La Figure 18 nous démontre les différents composants de la perfusion cérébrale avec la pompe Alzet. Les souris expérimentales ont reçu un total 6 µL d'une solution à 1 µM de l'agoniste GPR120 III durant 24 heures quotidiennement dans du DMSO à 1%, alors que le groupe témoin n'a été traité qu'avec la solution véhicule (1% DMSO + saline) en recevant la même quantité à tous les jours.

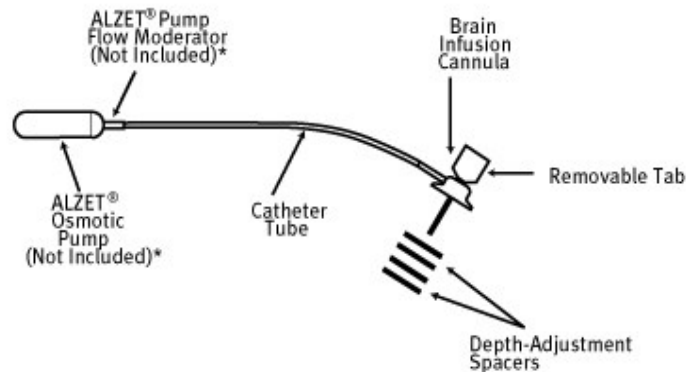


Figure 18: Une pompe osmotique ALZET et les composants de la perfusion cérébrale (assemblage du kit avant l'implantation cérébrale).

Source image: [http://www.alzet.com/products/brain infusion kit/how it works.html](http://www.alzet.com/products/brain%20infusion%20kit/how%20it%20works.html)

#### 2.3.1.4. Validation de l'emplacement de la canule

Pendant l'injection aiguë la confirmation de l'emplacement exact de notre canule dans le ventricule latéral a été réalisée avec une expérience de stimulation de la soif par l'angiotensine II en injectant lentement pendant 5 minutes 1 µl d'Angiotensine II (AgII, 10 mg) à chacune des souris.

Par souci de contrôle de qualité, nous voulions valider l'emplacement de l'injection chronique, avant d'effectuer les chirurgies. Nous avons vérifiés le bon emplacement de la canule et des coordonnées cibles en réalisant des séances de pratiques chirurgicales avec des souris pilotes. Après un certain nombre de pratiques, la localisation de l'emplacement exact de la canule a été vérifiée sur 5 souris en injectant lentement 2 µl de bleu de méthylène dans les canules au moment de la chirurgie alors qu'elles étaient toujours sous anesthésie. Cinq (5) minutes d'attente furent nécessaires afin que le colorant puisse circuler à travers les ventricules. La décapitation s'est suivie immédiatement après euthanasie des souris afin de récupérer le cerveau qui fut rapidement congelé dans l'isopentane et sectionné en micro-



tranches au niveau du point d'entrée de la canule. La visualisation au microscope optique de tranches du tissu cérébral a confirmé la diffusion du colorant à travers les deux hémisphères ventriculaires.

### **2.3.2. Diètes**

La diète standard régulière chow (Teklad Global 18% Protein Rodent Diet; Teklad Diets, Madison WI) contient 24 % de protéines, 18 % de gras et 58 % de hydrates de carbone. Les différents éléments contenus dans la diète standard régulière se trouvent en annexe 2.

La diète hypocalorique ou un régime faible en gras (LFD; D12328; Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ) contient 10,5 % Kcal de matières grasses; 16,4 % Kcal de protéines et 73,1 % Kcal de hydrates de carbone, similaire à la diète standard régulière chow. Les différents éléments contenus dans la diète hypocalorique se trouvent en annexe 3

La diète hypercalorique, obésogène, riche en matières grasses et en sucre (HFD; D12331; Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ) contient 58 % Kcal de matières grasses (l'huile de noix de coco qui est un acide gras saturé hydrogénée), de gras trans; 16,4 % Kcal de protéines et 25,5 % Kcal d'hydrates de carbone. Les différents éléments contenus dans la diète hypercalorique se trouvent en annexe 4.

### **2.3.3. Devis de recherche**

La stratégie de recherche choisie fut une expérience provoquée. Le devis choisi a une orientation prospective avec des études contrôlées à attribution au hasard (aléatoire avec une distribution alternée l'une à la suite des autres) au cours des deux approches expérimentales.

### **2.3.3.1 Approche systémique**

Le devis est de type post-test seulement avec un groupe témoin aléatoire. Ce type de devis a été retenu puisqu'il est mieux approprié aux stratégies de la recherche expérimentale. Il permet de contrôler la variable indépendante qui est la diète. Un devis pré-test renforcerait la validité interne, mais des chercheurs ont démontré lors d'études similaires réalisées sur les rats une diminution significative d'ADH dans le cerveau du groupe déficitaire comparativement au groupe ayant une diète adéquate [168]. En nous basant sur ce résultat, nous estimons que le devis post-test convenait à notre étude.

Dans ce type de devis, le groupe expérimental est exposé à une diète déficitaire en AGPI N-3 et le groupe contrôle est utilisé à titre de groupe témoin recevant une diète adéquate en AGPI N-3. La composition des ingrédients demeure pratiquement identique avec les 2 diètes à la seule différence que la diète adéquate contient de l'ADH et de l'huile de lin. Les souris sont réparties au hasard alternativement dans l'un ou l'autre des groupes et sont considérées comme équivalentes au départ et différentes seulement en fonction qu'elles reçoivent ou non des AGPI N-3 dans leur diète. En comparant les résultats obtenus, ce devis permettait de vérifier si le groupe expérimental se différenciait du groupe contrôle par rapport à la répartition aléatoire considérée. De ce fait, si l'une ou toutes les observations furent différentes entre les 2 groupes, la seule explication possible de cette différence demeure la présence ou non de l'ADH dans la diète. Mais lorsqu'on introduit la variable de diète hypercalorique, il faut tenir compte des effets que cette diète peut avoir au sein des 2 groupes, particulièrement le groupe expérimental.

### 2.3.3.2 Approche centrale

#### - Stimulation aigüe

Dans ce cas, il serait juste de considérer, une autre variante du devis qui est le devis factoriel où il est possible d'évaluer l'influence de plus d'un facteur, autant les effets propres de chacun que ceux des combinaisons de ces facteurs. Dans ce type de devis, chaque souris était son propre contrôle puisqu'elle a reçu dans un premier temps le véhicule, puis la faible dose de l'agoniste GPR120, la dose maximale de l'agoniste GPR120 et finalement l'agoniste GPR40. Nous avons réalisé nos injections à un rythme de J1, J3, J5 en laissant un jour d'intervalle entre les injections. Cette période était suffisante pour éliminer l'effet de l'injection précédente sur la suivante puisqu'au-delà de ce temps alloué il n'y avait plus d'effet sur la prise alimentaire. Nous avons observé un retour à la normale de cette prise alimentaire.

#### - Stimulation chronique

La modification du protocole nous a menés à une étude de cohorte avec groupe de contrôle parallèle. Cette fois les groupes étudiés ont été répartis selon leur exposition ou non à l'agoniste sans qu'il n'y ait d'influence sur l'appartenance des souris à un groupe ou l'autre. Les souris furent observées de façon prospective et sans connaître l'impact de l'injection centrale de l'agoniste au niveau du système nerveux central.

Pour ce type de devis, le groupe expérimental est exposé à l'agoniste GPR120, alors que le groupe « *contrôle* » sert de groupe témoin et reçoit le véhicule. Étant donné que les souris sont réparties au hasard dans l'un ou l'autre des groupes pendant la chirurgie pour l'implantation des pompes (véhicule ou agoniste), elles sont considérées équivalentes au départ et différentes seulement lorsqu'elles ont reçu ou non l'agoniste au niveau central.

### **2.3.4. Mesure des variables dépendantes**

Les tests comportementaux ont été réalisés dans une pièce attenante à l'animalerie en respectant les mêmes conditions de température et d'humidité que la salle d'élevage. Le contrôle de la prise alimentaire et du poids a toutefois été réalisé dans la salle d'élevage et d'hébergement. Les animaux hébergés dans des cages individuellement ont été pesés avant chacun des tests. Chaque test utilisé permet d'évaluer une composante comportementale particulière de l'animal dont le niveau d'anxiété et de dépression, l'activité locomotrice, la balance énergétique, les capacités d'apprentissage, de mémorisation et de motivation alimentaire.

#### **2.3.4.1. Mesure du poids corporel**

À l'aide d'une balance électronique et d'un récipient métallique, le poids des souris est mesuré tous les 2 jours avant 10 h en les retirant de leur cage. Cette pratique est utilisée dans plusieurs études afin d'effectuer la prise de poids des rongeurs. Comparativement aux humains, la détermination du poids (en termes de surpoids ou d'obésité) chez les rongeurs n'est pas évaluée sur l'indice de masse corporelle (IMC).

#### **2.3.4.2. La composition corporelle**

La masse grasse et la masse maigre sont estimées à partir du système *EchoMRI* (Imagerie par résonance magnétique échographique) (Echo Medical Systems, Houston, TX, USA) en moins de 4 minutes auprès de la progéniture âgée de 20 semaines. Cette mesure non invasive a été réalisée sur des souris conscientes et non sous anesthésie ou de sédatif. Cette technique a été utilisée et validée par Nixon et al. [426].

### **2.3.4.3. Mesure de la prise alimentaire**

#### **- Prise *ad libitum***

L'un des mécanismes les plus biologiques, physiologiques et comportementaux, qui dépend du SNC est celui de l'instinct pour la consommation alimentaire. Afin de mesurer la consommation alimentaire individuelle *ad libitum*, chaque souris a été placée dans une cage individuelle. À tous les deux (2) jours, des mesures ont été prises à des moments précis de la journée (avant 10 h, moment du début du cycle inversé) par la même personne et avec les mêmes instruments (balance électronique et contenant en métal). La quantité de nourriture consommée a été mesurée en tenant compte de la différence entre le poids de granules de nourriture données l'avant-veille et le poids de granules restant le jour de la collecte.

#### **- Tests de motivation alimentaire dans « *l'operant chamber* »**

Le paradigme de ce test est conçu afin d'évaluer le comportement de motivation alimentaire. L'effet gratifiant du stimulus se reflète par la volonté et l'effort des rongeurs à pour accéder à l'aliment fournissant un réconfort. La souris est habituée à un léger stress quotidien, occasionné par la manipulation de l'examineur. Elle s'habitue rapidement à cette manipulation mineure, sachant que cette manipulation puisse la conduire à une récompense alimentaire. Cet appareil fournit les moyens d'évaluer le niveau de volonté et d'effort de la souris au travail (par exemple, appuyez sur une barre) pour obtenir un aliment savoureux, une palette de sucrose. Il reflète ainsi l'état de motivation de l'animal en déterminant un niveau seuil de la valeur des récompenses obtenues. La chambre d'opérant (la boîte de Skinner, nom originel de son inventeur le professeur Burrhus Frederic Skinner) pour les souris (Med Associates, Inc ; St. Albans, VT, USA, MED- 307W - D1) est composée de polycarbonate

mesurant 32cm x 25cm x 33cm. Elle est isolée afin de minimiser les stimuli environnementaux extérieurs. Elle possède un sol en grillage à barres horizontales espacées de 2 cm l'une de l'autre en acier inoxydable et d'un plateau en acier inoxydable en dessous (permettant de recueillir les fèces, l'urine et les aliments non consommés). Elle contient un capteur de stimulus sonore et des stimuli lumineux de repères situées au-dessus de chaque levier ainsi que d'un orifice distributeur fournissant des palettes granulées (ou granules) de 2 mg de saccharose préfabriquées et dosées par une compagnie (Bio-Serv, Frenchtown, NJ, Precision Pellet, NJ, USA). La cage comprend deux leviers rétractables ultralégers (actif et inactif). La presse du levier actif allume une lumière (délai d'attente de 30 secondes) qui vient libérer une palette de sucrose. La presse du levier non actif quant à elle n'a pas de conséquence (pas de signal lumineux ni de livraison de palette de sucrose). La photo 8 nous montre la souris activant un levier.

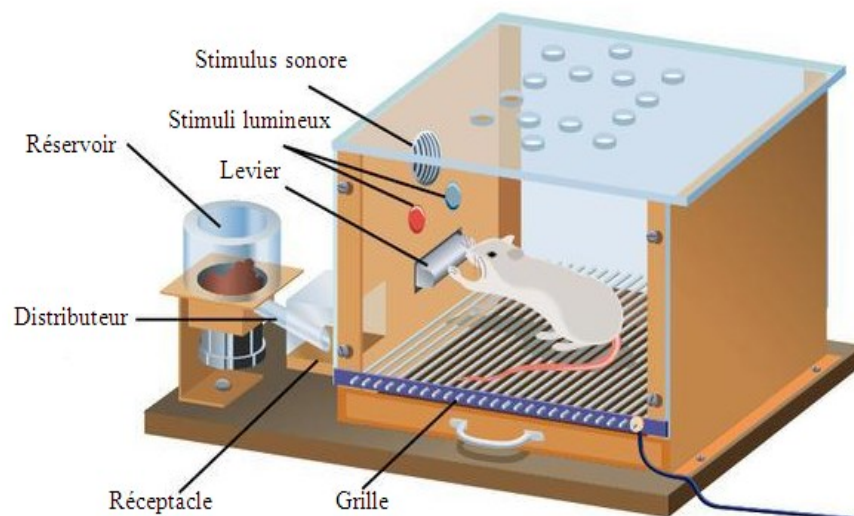


Figure 19: *Operant Chamber*

Source image: <http://www.apppsychology.com/operantconditioning>

Avant de réaliser l'expérience, les souris ont été entraînées pour appuyer sur le levier actif afin d'obtenir une récompense. Afin d'augmenter la capacité et la vitesse d'apprentissage pour la tâche de répondre par la pression sur le levier actif, une légère réduction de la portion alimentaire a été prescrite aux souris. Pour cela, elles ont reçu environ 2 grammes par jour de leur diète ordinaire (soit une réduction d'environ de 50 % de leur ration de base) jusqu'à réduction de 10 % du poids initial (durant 2-3 jours). Elles ont par la suite été maintenues à un niveau de masse corporelle de 90 % en donnant environ 2,3 à 2,5 grammes par jour et ce, pendant toute la durée de l'apprentissage (4-10 jours). Les souris ont été pesées quotidiennement afin de s'assurer qu'elles ne perdent pas plus que 10 % de leur poids initial et la quantité de nourriture a été ajustée en conséquence. À l'âge d'environ 21 semaines, les souris de chacun des groupes ont été évaluées à tous les jours dans le « *operant chamber* » pendant 1 heure pour ensuite retourner dans leur cage respective.

Pendant ces séances d'entraînement, les souris apprennent en premier lieu sur un calendrier à ratio fixe 1 à appuyer sur le levier actif désigné afin d'obtenir un aliment savoureux (récompense alimentaire délivrée : palette de sucrose), (FR1) (où une presse du levier actif offre une seule palette de 20 mg de l'aliment savoureux). L'attribution de levier de droite et de gauche a été balancée entre les souris et le nombre maximum de 50 granules (1 gramme) pouvant être obtenu lors de la session de l'expérience totalisant 1 heure. Le nombre de pressions correctes (levier actif) et incorrectes (levier inactif) a été enregistré. Lorsque les souris ont atteint plus de 80 % de réponses positives (levier actif donnant une réponse correcte) pendant trois jours consécutifs elles ont été transféré à l'étape du ratio fixe 1 suivi de 5 secondes de temps d'arrêt (*timeout*; TO) (FR1/TO-5), puis à un ratio fixe 5:1 (FR5) (5 réponses correctes pour une seule récompense). Nous avons terminé l'expérience avec un ratio

progressive où le nombre de pressions sur le levier actif pour obtenir une palette fut augmenté au cours des essais en utilisant le calendrier de renforcement progressif (PR) suivant du rapport : 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 30. Grâce au PR, l'animal doit effectuer un nombre croissant de réponses positives (presser sur un levier actif) afin d'obtenir sa récompense alimentaire palatable, cela fournissant une valeur seuil indicative des variations du nombre de récompense par la nourriture. Cette augmentation de ratio progressif (PR) est considérée en tant que motivation accrue pour l'obtention de nourriture [427]. Lorsqu'une souris échoue dans une séance de ratio spécifique pendant deux séances consécutives cette limite est appelée le point d'arrêt, utilisé dans l'analyse. Ce point seuil ou point d'arrêt (*break point*) correspond à la limite de l'effort fourni par l'animal pour obtenir sa récompense. La motivation alimentaire est mesurée en fonction du seuil de réponse afin d'obtenir l'aliment savoureux. Plus un animal est motivé à travailler fournir un effort et plus il obtiendra des granules de sucrose [428, 429]. À noter qu'au cours de l'expérimentation, les souris n'ont pas été placées sous restriction alimentaire. Après chaque session, les souris ont été remises dans leurs cages respectives où elles ont eu accès à de la nourriture régulière de base et à l'eau à volonté.

#### **2.3.4.4. Évaluation du comportement de type anxieux et dépressif**

Les différentes expériences régulièrement utilisés pour l'étude comportementale d'un rongeur adulte reposent sur le principe de laisser l'animal explorer spontanément son environnement tout en relevant des différences variables et précises procurant les renseignements sur le registre comportemental de l'animal. Chacune des souris a été exposée au hasard à un test de comportement unique dans le temps et n'a jamais eu à refaire le même test afin d'éviter les biais d'accoutumance potentielle.



Le comportement de type anxieux se traduit par un conflit « approche-évitement » entre l'envie naturelle du rongeur d'explorer un environnement nouveau (comportement exploratoire inné) et sa peur des espaces ouverts (qui ne le protègent pas des prédateurs). La mesure d'un tel comportement a été réalisée à l'aide de deux appareils largement utilisés afin d'évaluer le niveau d'anxiété des animaux et pour mesurer différents anxiolytiques, anciens et nouveaux [168, 408] : l'*Elevated Plus Maze* (EPM) communément appelé le labyrinthe en croix surélevé (LCS) et l'*open-field test* (OFT) ou test à champ ouvert. Nous avons jugé au préalable de réaliser nos expériences dans une salle éclairée en lumière blanche contrairement à d'autres études comportementales utilisant une salle éclairée avec une lumière rouge et faiblement perceptible par les rongeurs [430]. À cet effet, il a été démontré que la différence entre la présence ou l'absence de lumière blanche peut modifier le comportement de l'animal [431].

#### **2.3.4.4.1. Le labyrinthe en croix surélevé (LCS)**

*Principe* : Basé sur les travaux de Montgomery [432], le labyrinthe en croix surélevé a été mis au point par Handley et Mithani [433] puis validé chez le rat par Pellow et al., [434] en 1985. Cette expérience fut basée sur le comportement des rongeurs face à leur aversion naturelle envers les zones ouvertes et élevées, anxiogènes, par crainte du vide, ainsi que du conflit interne entre la motivation innée d'explorer et un nouvel environnement [435, 436]. Le LCS est le test ayant démontré la meilleure sensibilité aux effets anxiolytiques du diazépam et du chlordiazepoxide [437, 438]. La figure 20 nous illustre le LCS.

*Dispositif* : Le LCS (Med Associates, Inc., St Albans, VT, USA) est composé de quatre bras : deux bras fermés (BF; 30 x 8 x 15 cm) et deux bras ouverts (BO; 30 x 8 x 15 cm) qui se

croisent à une intersection par une zone centrale (ZC; 8 x 8 cm) donnant l'apparence d'une croix surélevée à 60 cm par rapport au niveau du sol à l'intérieur d'une piscine vide ( de telle sorte que si une souris devait tomber de l'un des bras ouverts elle n'aurait aucun moyen de s'en échapper. Lors du test, l'appareil est entouré d'un rideau en plastique uniforme de sorte que l'examineur soit à l'abri de la vue de l'animal et qu'il n'y ait aucun signal contextuel pouvant influencer son entrée dans l'un des bras. La ZC et les BF représentent des espaces protégés et non anxiogènes tandis que les BO sont des zones découvertes, aversives et anxiogènes. Des études validées par les anxiolytiques ont permis d'établir une corrélation entre le niveau d'anxiété de l'animal et la période de temps passé dans les BO [439]. La Photo 9 représente le LCS ou EPM.

*Procédure* : Au début de l'expérience, la souris est déposée délicatement dans la ZC et la tête orientée vers un BO la laissant libre d'explorer son environnement pendant 5 minutes.

*Variables mesurées* : La distance parcourue en mètres, les fréquences et la durée dans chacun des bras sont filmées et enregistrées à l'aide d'une caméra vidéo fixée au-dessus du labyrinthe et connectée à un ordinateur par le logiciel Ethovision XT pendant une durée de 5 minutes. Une réduction du pourcentage du temps passé et du nombre d'entrées dans les BO sont pris en compte à titre indice d'anxiété et ce, indépendamment de l'activité locomotrice. Plus la souris passe de temps dans les BF et plus son niveau d'anxiété est élevé. Un animal ayant un comportement de type anxieux aura naturellement tendance à préférer les bras fermés aux bras ouverts [440]. Après chaque essai, la souris est retirée et replacée dans sa cage. Tous les bras et la zone centrale sont nettoyés avec une solution d'éthanol (ETOH 70 %), afin d'éviter afin d'éviter les interférences possibles causés par la souris précédente comme par

exemple, des odeurs, des résidus alimentaires, des fécès et l'urine. Cette technique de nettoyage est utilisée dans la majorité des études comportementales chez les rongeurs et a été vérifiée dans le protocole des tests du conditionnement de trace et de la peur [441].

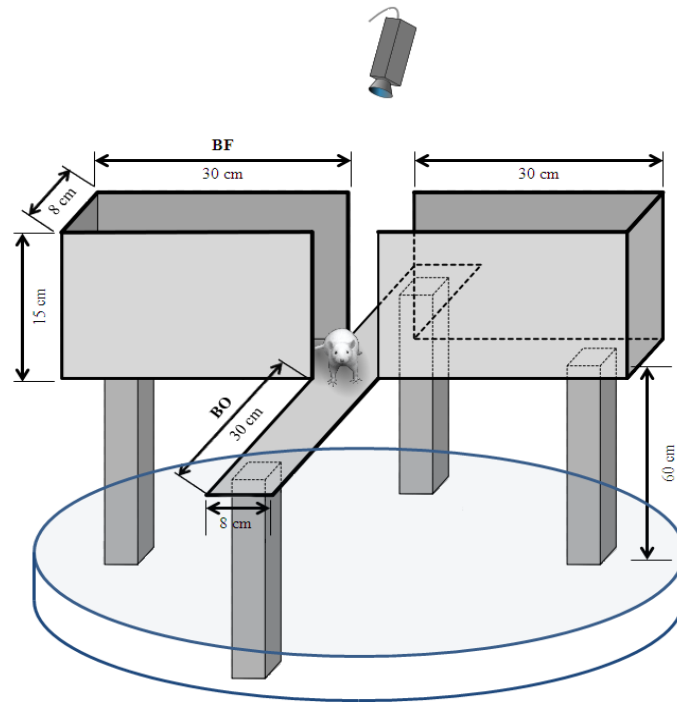


Figure 20: Illustration du Labyrinthe en croix surélevé.

BO : Bras ouvert ; BF : Bras fermé

#### 2.3.4.4.2. Le test à champ ouvert

*Principe* : Mis au point par Hall et Ballechey [442], cet appareil permet d'évaluer l'état émotionnel de type anxieux ainsi que le niveau d'activité locomotrice et exploratoire de l'animal. L'expérience est basée sur le comportement aversif naturel de l'animal à l'égard des environnements découverts.

*Dispositif* : Il s'agit d'une arène à espace ouvert, de forme carrée (50 × 50 cm) et d'une hauteur de 30 cm. Le plancher est divisé en 3 zones carré de taille différente et imbriquée afin de délimiter une zone centrale (ZC), intermédiaire (ZI) et périphérique (ZP) à proximité de la paroi. Ainsi plus l'animal passe de temps dans la ZP (représentant une zone protégée) et moins il est anxieux. À l'inverse, plus il passe de temps dans la ZC (représentant une zone anxiogène puisqu'elle est découverte) et plus il est anxieux. La Photo 10 représente l'appareil de l'Open field ou le champ ouvert. La figure 21 illustre le champ ouvert.

*Procédure* : La souris est placée initialement à un angle de l'arène et laissée libre d'explorer son nouvel environnement pendant 5 minutes pour explorer son nouvel environnement. La session se déroulant dans une salle éclairée à la lumière blanche normale est filmée et enregistrée par le logiciel Ethovision XT afin que les données soient analysées par la suite.

*Variables mesurées* : La distance totale parcourue (mètres) et le temps passé dans chacune des zones permettent d'évaluer le niveau d'anxiété de l'animal observé. Par sa simplicité et sa rapidité d'analyse [443], *l'open-field* est couramment utilisé pour l'étude du comportement animal en laboratoire. Plus l'animal demeure près des murs et plus il est anxieux. La contrainte dans *l'open-field* est par contre moins forte que celle créée dans le LCS, ce qui permet de détecter des variations plus sensibles du niveau d'anxiété des animaux [444]. Après chaque essai la souris est retirée et replacée dans sa cage. Tout le champ est nettoyé avec une solution de ETOH 70 % avant le test de l'autre souris.

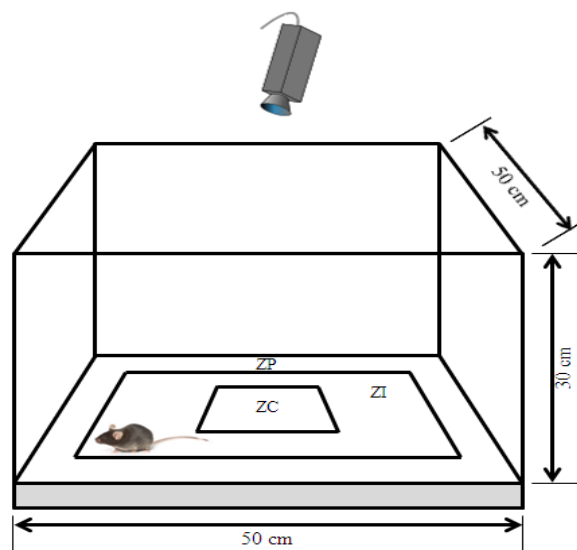


Figure 21: Illustration de l'Open-field

ZP : Zone périphérique ; ZI : Zone intermédiaire ; Zone centrale

### 2.3.4.4.3 Le test de suspension caudale (TST)

*Principe* : Le test de suspension par la queue automatisé (Med Associates, St Albans VT) a été utilisé afin de déterminer le comportement de type dépressif. La contrainte hémodynamique à l'effet d'être suspendu d'une façon incontrôlable par la queue force l'animal à se livrer à trois types de mouvements pour essayer de s'échapper: (1) des mouvements de courir en avant ou en arrière; (2) des torsions du corps avec des tentatives pour attraper le corps suspendu; et (3) des secousses du corps suivi temporellement par des épisodes d'immobilité [445, 446].

*Dispositif* : Le dispositif automatisé (Med Associates, St Albans VT) est composé d'une boîte (taille de la boîte:  $32 \times 32 \times 33 \times 33$  cm) ouverte sur la face avant avec une barre verticale en aluminium (taille de la barre:  $11,5 \times 2,2 \times 0,15$  cm) et un crochet suspendu par le haut permet de relier la boîte à un capteur détectant les mouvements de la souris.

*Procédure* : La souris est suspendue par la queue et fixée à un ruban adhésif pendant 6 minutes au crochet. La durée totale d'immobilité est calculée le moment où la force des mouvements de la souris est inférieure à un seuil prédéfini. Le seuil inférieur optimal est déterminé en comparant les résultats de l'immobilité avec des résultats de l'appareil automatisé. L'immobilité est définie lorsqu'il y a absence de mouvements initiés et balancement passif. Un seuil supérieur est également déterminé afin de détecter uniquement les mouvements vigoureux.

*Variables mesurées*: L'équipement automatique contrôle la durée d'immobilité en dessous du seuil inférieur. La vigueur de l'activité est quantifiée et correspond soit à des mouvements de torsion du corps soit à des mouvements de secousses au-dessus du seuil supérieur. Après chaque essai la souris est détachée du crochet et replacée dans sa cage. L'intérieur de l'appareil est nettoyé avec une solution de ETOH 70 % avant de tester la prochaine souris.

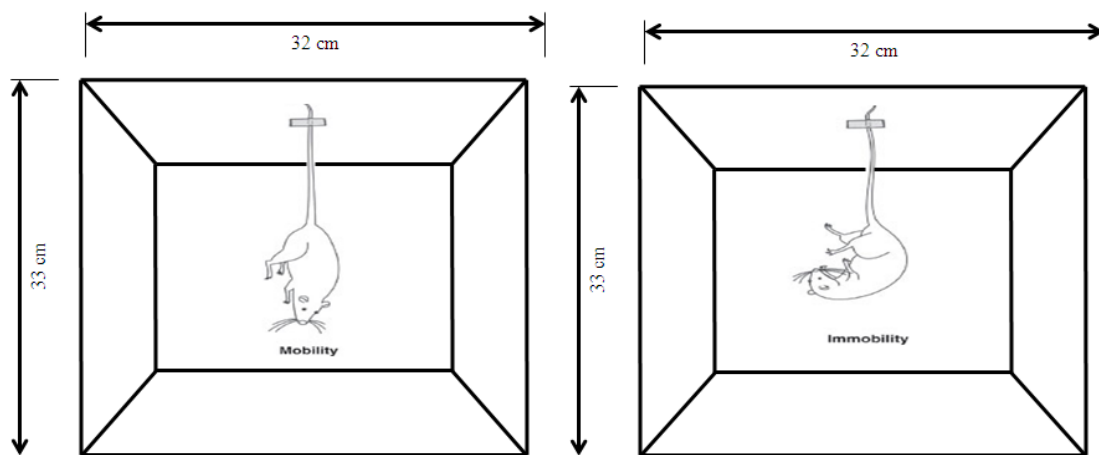


Figure 22: Représentation schématique de la mobilité et l'immobilité dans le test de suspension caudale.

#### **2.3.4.5. Les modifications de la dépense énergétique**

Afin d'évaluer leur dépense énergétique les souris sont soumises à des mesures calorimétriques indirectes. En effet, la chaleur produite par les processus métaboliques peut-être calculée à partir des échanges gazeux (consommation d'O<sub>2</sub> et rejet de CO<sub>2</sub>), pendant une période de 4 à 5 jours consécutifs par l'utilisation d'un système de surveillance spécial pour souris « Comprehensive Lab Animal Monitoring System » (CLAMS; Columbus Instruments, Ohio, USA), communément appelé cages métaboliques. Les souris sont familiarisées, pendant une période de 2 jours aux cages métaboliques en plexiglas fermées hermétiquement dont le volume est adapté à la morphologie des souris afin de minimiser le volume mort. Par la suite, les mesures sont recueillies pour la balance des 72 heures nous fournissant ainsi des données du cycle de jour (22:00-10:00) et du cycle de nuit (10:00-22:00). Le système comprend 10 cages placées dans une enceinte fermée et isolée à température ambiante maintenue proche de la température ambiante dans laquelle les souris sont hébergées. Les cages possèdent un orifice assurant l'entrée d'air et une sortie sur le côté opposé à cette entrée. Cette sortie est reliée à un système de pompe qui aspire l'air à débit constant pour ensuite l'envoyer dans un circuit d'analyse de gaz. Le débit des pompes est mesuré par un débitmètre massique (précision <1 %; Tylan FM 380) est de 1 L/min. Le système d'acquisition procure en temps continu et en temps réel une valeur de fraction de CO<sub>2</sub> et une valeur de fraction d'O<sub>2</sub> dans la sortie de la cage ainsi que l'activité totale, la dépense énergétique basale, l'activité ambulatoire et ce, toutes les 14 minutes, pour chacune des cages. Ces mesures sont réalisées grâce au «CLAMS data eXamination Tools» (CLAX), un logiciel adapté à l'appareil, qui à la fin de l'expérience analyse systématiquement et accumule les données de tous les jours,

donnant des résultats continus [447]. Dans les cages métaboliques, les souris ont libre accès à la nourriture et à l'eau.

#### **2.3.4.6. Évaluation du métabolisme glucidique et la tolérance à l'insuline de la progéniture**

L'évaluation du métabolisme glucidique des souris a été effectuée en mesurant la glycémie à jeûn lors de 2 tests différents. Débutant par le test de résistance à l'insuline puis par le test d'hyperglycémie provoquée par voie orale. Le test de mesure de résistance à l'insuline a été réalisé en suivant le protocole décrit par Poitout [448]. Les souris âgées d'environ 21 semaines ont été privées de nourriture pendant quatre heures (4h +/- 30 min) pour ensuite être pesées et placées dans des cages neuves avec grillage. La dose d'insuline administrée aux souris (0.9 U/kg ou 0.1 ml/10g) a été aspirée avec une seringue de 1 cc munie d'une aiguille de 25G. On a mesuré la glycémie de départ (t=0) et on a administré la quantité d'insuline diluée par injection intra-péritonéale en contrôlant les glycémies à 15min, 30min, 45min, 60min, 90min et 120min. A la fin de l'expérience les souris ont été transférées dans une cage avec de la nourriture et de l'eau. L'insuline utilisée était le Humulin-R 100U/ml (Eli Lilly, HI-120).

Deux semaines après ce test de résistance à l'insuline nous avons procédé au test de tolérance au glucose faisant suite à l'hyperglycémie provoquée par voie orale. Le protocole suivi a été réalisé tel que décrit par Poitout [448]. Les souris âgées d'environ 23 semaines ont été cette fois-ci privées de nourriture le soir avant l'expérience prévue le lendemain (soit 16h +/- 30 min). Les souris avaient été placées dans des cages neuves avec grillage afin d'éviter qu'elles mangent leurs fèces ou les restes de nourriture dans le fond de leur cage. Elles ont été



pesées le jour du test. On a calculé le dosage de dextrose 20 % à administrer à chacune des souris (soit 2g/Kg) l'équivaut de 0.01ml/kg (gr) ayant été aspirée par une seringue de 1 cc munie d'une aiguille à gavage adaptée pour les souris. On a mesuré la glycémie de départ (t=0) puis administré immédiatement la solution glucosée par gavage afin de contrôler les glycémies à 15min, 30min, 45min, 60min, 90min et 120min. A la fin de ce test, les souris ont été transférées dans une cage avec de la nourriture et de l'eau. La mesure de la glycémie a été réalisée en déposant une goutte de sang de la souris sur une bandelette pour glucomètre (Accu-Check Advantage) ayant été obtenue en sectionnant le bout de la queue. La lecture de la glycémie a été effectuée à partir du glucomètre correspondant à la bandelette (Accu-Check Advantage).

### **2.3.5. Collecte et traitement des données**

La collecte des données est établie selon les différents processus expérimentaux précédemment décrits. L'ensemble des données sont collectées et analysées par moi-même, auteure du protocole et de ce document de thèse.

Les fiches de collectes de données pour l'OGTT et l'IP-ITT sont présentées en annexe 8. Les données collectées sont saisies à l'aide du logiciel Microsoft Excel version 2007 puis transférées dans graphpad prism version 6.0 pour la réalisation des graphiques. Les autres données sont automatiquement collectées par les logiciels et transférées dans graphpad prism version 6.0 pour la réalisation des graphiques. Des fréquences absolues, la médiane, le minimum et le maximum seront calculés afin de détecter les valeurs aberrantes (outliers). Ces valeurs aberrantes ont été effectuées par un test de Grubb's (aussi appelé méthode « *extreme studentized deviate test – ESD* ») dans graphpad prism version 6.0 visant à déterminer si

certaines valeurs étaient statistiquement aberrantes (à  $p < 0.05$ ). Advenant qu'une ou plusieurs valeurs soient aberrantes, elles ont été exclues des analyses.

### **2.3.6. Analyses statistiques**

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) et présentées exprimés en moyennes  $\pm$  l'erreur type (SEM). L'analyse de variance à deux voies (Two-way ANOVA) suivi du test de Sidak's a été utilisée pour les comparaisons multiples dans le premier article, tandis que l'analyse de variance à deux voies (two-way ANOVA) suivi du test de Bonferroni post-tests a été utilisé pour les comparaisons multiples. Les résultats ont été et considérés significativement différents pour un  $p \leq 0,05$ . Dans une même journée d'expérimentation, l'ordre des animaux fut évalué de manière aléatoire entre les différents groupes afin d'éviter l'effet de cycle circadien sur l'activité des souris. Les différentes analyses statistiques employées seront détaillées ultérieurement et séparément pour chaque article.

### **2.3.7. Considération éthique**

Les recommandations pour l'utilisation et l'élevage d'animaux de laboratoire ont été respectées selon les protocoles d'expérimentations qui ont été approuvés par le comité d'éthique en expérimentation animale de l'Université de Montréal. Vous trouverez en annexe 9 les différents documents d'acceptation de notre protocole de recherche enregistré au numéro An10038SF ainsi que les accords des coauteurs pour les différents articles.

**Chapitre 3: Perinatal deficiency in dietary omega-3 fatty acids potentiates adiposity and suppresses locomotor activity on a high-fat diet**

**Title: Perinatal deficiency in dietary omega-3 fatty acids potentiates adiposity and suppresses locomotor activity on a high-fat diet**

**Auteurs:** Stéphanie Auguste\*, Sandeep Sharma, Christine Des Rosiers and Stephanie Fulton

Manuscrit en préparation et sera soumis au Journal of Nutrition 2015

**Contribution des auteurs:**

**Stéphanie Auguste :** Auteure principale. A élaboré les hypothèses, conçu et réalisé les expériences, a analysé les données et rédigé le manuscrit.

**Sandeep Sharma :** Coauteur a participé à l'élaboration du protocole de recherche et à la correction du manuscrit.

**Dr Christine Des Rosiers:** collaboratrice. Le dosage des acides gras a été réalisé dans son laboratoire au Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal.

**Dr Stephanie Fulton :** Directrice de thèse. A dirigé tout le projet.

**Perinatal deficiency in dietary omega-3 fatty acids potentiates adiposity  
and suppresses locomotor activity on a high-fat diet**

Stéphanie Auguste<sup>1,2</sup>, Sandeep Sharma<sup>1</sup>, Christine Des Rosiers<sup>2,3</sup> and Stephanie Fulton<sup>1,2</sup>

1-CRCHUM and Montreal Diabetes Research Center; 2- Montreal Heart Institute; 3-Department of  
Nutrition, Faculty of Medicine, Université de Montréal, QC, Canada H3T 1J4

Running title: Omega-3 deficiency, reward and anxiety

## **Abstract**

**Objective:** To determine the impact of dietary deficiency in omega-3 fatty acids (N-3) during the perinatal period on energy balance, food-motivated behavior and anxiety in mice fed a high-fat or chow diet.

**Methods:** Pregnant C57Bl6 mice were submitted to a diet that was either deficient or sufficient (control) in N-3 fatty acids until post-natal day 21. Male pups (litters of 7-10 pups) were weaned onto a regular chow diet. Brain fatty acid profiles of offspring were measured via gas chromatography mass spectrometry. Adult mice were trained and tested in a progressive ratio operant task to assess the rewarding effects of sucrose. Food intake and body weight were measured in another group of mice subjected to a high-fat or control diet followed by behavioral measures of anxiety-like behavior (elevated-plus maze and open field test).

**Results:** Perinatal dietary N-3 deficiency decreased brain concentrations of N-3. N-3 deficiency had a tendency to increase the number of sucrose rewards earned in the operant task but did not affect operant learning. **Conclusion:** Perinatal deficiency in N-3 can promote a trend in motivation for rewarding food and in the context of high fat diet can altered anxiety and body weight. These findings support evidence suggesting adequate dietary N-3 as a means to protect against weight gain and associated pathologies.

**Keywords:** omega-3 deficiency, energy balance, perinatal, anxiety, high-fat diet, food-motivated behaviour.

## **Introduction**

Coinciding with rising obesity rates, the last century has witnessed a major increase in the intake of saturated fats along with a decline in essential omega-3 polyunsaturated fatty acids (N-3) [1]. This situation has dramatically lowered the N-3 to N-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) ratio in the western diet [2]. Excess saturated fat intake is associated with weight gain and obesity and both saturated high-fat diet (HFD) and reduced N-3 consumption are individually linked to impairments in emotional processes and heightened risk of neuropsychiatric disease. Dietary deficiency in N-3 has been shown to increase anxiety-like behaviour in rodents [3, 4] whereas insufficient N-3 intake is associated with increased incidence of depressive and anxiety disorders [5-7]. We previously found that prolonged intake of a saturated high-fat diet (HFD) promotes anxiety-like behavior [8, 9] and diminishes brain reward function [10] in rodents. Similarly, high-fat feeding and obesity in humans is associated with reward impairments [11] and increased risk of mood disorders [12-15]. Despite these findings, the impact of N-3 dietary deficiency and its interaction with a saturated high-fat diet in the control of feeding, energy balance and development of anxiety is poorly understood.

Docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA) and alpha-linolenic acid (ALA) are the three main N-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). As a key structural component of cell membranes [16], DHA accumulates in the brain during perinatal development whereas dietary deficiency during this period leads to brain DHA depletion [17] and associated behavioural impairments [18]. Accordingly, several lines of evidence suggest that DHA has neurotrophic [19], neuroprotective [20], anti-inflammatory [21] and even anorectic functions in the brain [22], including in regions governing the appetite, energy

balance and mood. While inadequate dietary N-3 is linked to increased risk of metabolic disease [23], little is known about how the lack of N-3 deficiency affects appetite, energy balance and mood in the context of a saturated HFD. Here we determined the influence of perinatal N-3 deficiency during the perinatal period on the rewarding effects of food, feeding and body weight and anxiety-like behaviour in mice on a chow or HFD.

## **Materials and methods**

### **Animals and Diets**

All procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of the CRCHUM. Virgin male and female C57Bl/6 mice (Charles River, St Constant, Canada) received at 6-7 weeks of age were maintained in an environmentally controlled room (22-24°C) with *ad libitum* access to standard chow and water. Mice were acclimated to a reverse light/dark cycle for at least 7 days before initiation of experiments. All behavioural testing was carried out in the dark phase.

Female mice were time-mated using polygamous breeding scheme (2 female: 1 male). Upon verification of the vaginal plug (gestational day 0: GD0) female mice were individually housed and randomly divided into one of two groups: N-3 deficient (“N-3 Def”) or N-3 adequate (“N-3 Ad”) diet. All diets were custom made by Dyets Inc., were vacuum-sealed under nitrogen, and stored in the dark at 4°C until presentation to mice at room temperature. The experimental diets (Table 1) contained identical amounts of protein, carbohydrate and fat and varied only in the type of fat: As compared to the N-3 Ad diet, the N-3 Def diet lacked flaxseed oil and purified DHA (from algae) and was compensated with a higher content of coconut and safflower oils. Dams (and eventually offspring) consumed these diets from GD2-



3 until 3 weeks after birth when offspring were weaned. Mice derived from litters of 7 to 10 pups were selected for further study. Male pups were weaned onto a standard chow diet at 3 weeks of age and group housed whereas female mice were sacrificed for brain lipid analysis to confirm that diets had the expected effect on brain lipid species content. At 6 weeks of age, male mice were individually housed and continued either on a chow diet or a saturated HFD (58% kcal fat as hydrogenated coconut oil; D12231, Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ).

## **Experimental Procedures**

### ***Brain fatty acids***

Brains were quickly dissected and snap frozen. Brain fatty acid composition was determined using gas chromatography mass spectroscopy according to published procedures [24].

### ***Metabolic assessments***

Food intake and body weight were measured daily just before dark cycle onset in a second group of mice (N=45) consuming chow or high-fat diet (HFD) from 6 to 20 weeks of age. At 20 weeks of age fat and lean mass were measured in all mice using an EchoMRI (Echo Medical Systems, Houston, TX, USA). Locomotor activity (horizontal distance) was measured in an open field.

### ***Food-motivated operant responding***

A group of mice (N=13) consuming the chow diet were trained to press an ultra-light retractable lever for a food reward (20 mg sucrose pellet, Bio-Serv) in mouse operant cages (Med Associates, Inc.) on a progressive ratio (PR) schedule of reinforcement as described previously [25]. Briefly, mice were mildly food restricted in order to acquire the lever-

pressing task on a fixed-ratio (FR)-1 followed by a FR5 and PR schedules of reinforcement. Mice were returned to *ad libitum* feeding conditions during PR training. The number of active lever presses, rewards earned and the breakpoint ratio (last ratio successfully completed) were calculated by MedPC software (Med Associates, Inc).

### ***Elevated Plus Maze***

The elevated plus maze (EPM) was used as a primary test of anxiety-like behaviour in mice at 26 weeks of age, while still on their respective diets. Each mouse was placed in the middle of the elevated-plus maze (EPM; Med Associates, Inc., St Albans, VT, USA) facing the open arm opposing the experimenter. Movement in the maze was recorded and tracked for 5 min by an overhead video camera connected to a PC with Ethovision XT software.

### ***Open field test***

The open field test (OFT) was used as a secondary measure of anxiety-like behaviour in the same mice as above at 28 weeks of age. Each mouse was placed in the middle of the arena and allowed to explore the field for 5 min. Time spent in the center of the arena, center entries, were recorded and tracked by an overhead video camera connected to a PC with Ethovision XT software.

### **Statistical analysis**

Data were analyzed using GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) and presented as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). A two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison tests was used to compare FR1 responding, lever responses, body weights, body composition, food intake, and anxiety. An unpaired t-test was used to compare rewards earned on the PR task. Criterion for statistical significance was set at  $p \leq .05$ .

## Results

### Brain fatty acid profile

N-3 Def mice had a lower N-3/N-6 fatty acid ratio in the brain as compared to N-3 Ad mice (Table 2). Decreases in DHA and total N-3 did not reach statistical significance ( $p=.09$ ), but EPA and docosapentaenoic acid (DPA, 22: 5n-3) were significantly lower in N-3 Def mice. While these measures were carried out in females rather than males used for remaining experimentation, previous work suggest there is no difference in DHA accumulation in brain membranes phospholipids between males and females subjected to the same N-3 deficient diet [26].

### Perinatal N-3 deficiency increases fat mass and reduces locomotor activity on a high-fat diet but fails to affect feeding

N-3 deficiency and HFD had main effects to increase body weight (Fig. 1A, B) and fat mass (Fig. 1C), however pairwise comparisons revealed that only N-3 Def mice on HFD showed significant increases in body weight and fat mass at 20 weeks of age relative to controls. N3 Def mice on the chow diet had slight increases in lean mass relative to controls (Fig. 1D). While HFD increased caloric intake as expected, there was no difference between N-3 Def and N-3 Ad mice (Fig. 1E) on either diet suggesting that decreased energy expenditure contributes to increased body weight and fat mass of N-3 Def mice. In support of this idea, there was a main effect of N-3 deficiency to decrease ambulatory locomotor activity and a specific reduction in locomotion in N-3 Def mice consuming a HFD (Fig. 1F).

Although no changes in free-feeding intake under chow and HFD conditions were observed, we next sought to establish if effort-based behaviour for palatable sucrose was

altered by N-3 deficiency in chow-fed mice. Relative to N-3 Ad mice, N-3 Def mice showed no impairment in operant learning (Fig. 2A) nor alterations in the proportion of correct vs. incorrect lever presses (Fig. 2B). Evaluation of the number of reward earned and breakpoint response threshold on the PR task also did not reveal significant differences, however there was a trend ( $p=.08$ ) for increased sucrose pellets earned for the N-3 Def group (Fig.2C).

### **Perinatal N-3 deficiency increases anxiety in the open field test**

As N-3 deficiency has been shown to increase anxiety-like behaviour we set out to determine if perinatal N-3 deficiency differentially modulates anxiety-like behaviour on a chow and HFD. As illustrated in Figure 3, anxiety-like behaviour between N-3 Def and N-3 Ad mice did not vary according to diet. There were however main effects of N-3 and HFD to decrease entries (Fig. 3A) and center time (Fig. 3B) in the open field test. In addition, there was a main effect of HFD to decrease open arm entries in the EPM (Fig. 3C) but no change in open-arm time and no influence of N-3 deficiency in the EPM (Fig. 3C, D).

### **Discussion**

During the past decade several studies have targeted the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) as natural compounds that have important properties for health [27]. In the present study, we report that inadequate N-3 intake during the perinatal period leading to reduced brain N-3 concentrations potentiates body weight and fat mass gain on a HFD. Furthermore, the actions of N-3 dietary deficiency to increase adiposity during high-fat feeding were due to decreased energy expenditure as evidenced by comparable caloric intake and blunted locomotor activity. Despite no changes in free-feeding, N-3 deficiency in mice subjected to an

effort-based feeding task, produced a trend for increased motivation for palatable sucrose. Finally, N-3 deficiency increased anxiety-like behaviour similarly in chow and HFD mice

Comparing the impact of a diet that is devoid in N-3 versus one containing purified DHA plus flax seed oil, our results demonstrate that dietary deficiency in N-3 during perinatal development (~6 weeks) decreases EPA, DPA and a trend for lower DHA and produces a compensatory increase arachidonic acid (AA; 20:4n6) in the brain. These results are in agreement with previous study of whole brain fatty acid analysis in this mouse strain on N-3 deficient diet [28].

Despite the presence of homeostatic mechanisms in the CNS [29], the rewarding effects of palatable food can promote overeating and weight gain [30]. This pattern may play an important role in obesity or can emphasize a myriad of other factors that contribute to obesity. Perhaps the tendency to overeat in the N-3 Def mice fails to rely on inhibitory control mechanisms to limit the impact of this tendency since they have a lack of certain important nutrients in uterus. Since our N-3 deficient mice had more % of fat mass than the N-3 Ad group, we can suppose that obesity in itself may be an important factor modulating the tendency to work for food. Even though that Berthoud et al. [31] reported that obese rats fed with a high-fat diet showed a reduced tendency to work for food; an imaging studies suggest that obese relative to lean individuals show greater activation of the gustatory cortex and oral somatosensory regions in response to anticipated intake and consumption of palatable foods [32].

Thus, our study is mainly about behavior, we do know that in a biochemical point of view, the literature around the dopaminergic (DAergic) function is very complex [33] since

dopamine (DA) is highly selective for particular aspects of food motivation while leaving others basically intact [34, 35]. It remains to be seen if the dietary changes in the composition of N-3 PUFA will result in specific neurochemical changes in the circuits of dopaminergic neurons involved in learning and feeding motivation. We can think that the impairment of the dopamine tone may be contributing to the increased appetite in the offspring of N-3 deficient dams as it does in other rodent and human models of obesity [36].

Knowing that saturated fatty acid can induce inflammation and neuro-degeneration in the brain, causing anxiety, our results did not show any overall effect of N-3 and HFD to express the anxiety-like behaviour in either the open field or the EPM. Whereas the anxiety-like behaviour between N-3 Def and N-3 Ad group did not change according to either the HFD on the regular diet. This may be due to the fact that in a first place, we have a higher concentration of AA derived pro-inflammatory eicosanoids in the brain of N-3 Def mice and, consequently, the accumulation of N-3 PUFAs in the brain like EPA, DPA-derived mediators, which are anti-inflammatory are lower [37, 38]; and in a second place the effect of the HFD itself is a pro-inflammatory inducer [39] as we saw that the HFD itself cause a selling effect since the N-3 deficiency already increase the anxiety-like behavior. When comparing the two anxiety tests, we saw a trend of anxiety-like behaviour in N-3 deficient mice either on chow or HFD in the open field test whereas no difference where seen in the EPM. It is not surprising, since results can be different regarding the type of test used. Other studies including more mice need to be assessed to our hypothesis. And last but not least, N-3 PUFA also have important signalling actions, including via receptors such as GPR120 [40], which are suggested to mediate some of the anti-anxiety actions of N-3 PUFA.

A limitation of our study is that we cannot generalize our results in male mice to the female, since we know that intrinsic biological variations such as hormonal cycles of the females that require more specific techniques for the manipulations, the disproportionate impact that may have some diseases by sex, are causes for consideration. Also, knowing the health benefits associated with N-3 supplementation and the reduction of N-6 [41]. It would be interesting to have the same experiment with an N-3 supplemented group.

In summary, the present study demonstrates that a dietary N-3 deficiency during perinatal period have increase the body weight and the fat mass of male offspring placed on HFD but only increases the lean mass on regular chow. It did not change *ad libitum* food intake either on HFD or regular chow but has a trend to increase the motivation for sucrose. It affects the anxiety level showed with the *Elevated Plus Maze* and the *Open Field*. The quality of food affects the appearance of many mood disorders in a large population of adults [42]. The present study demonstrates that perinatal N-3 deficiency can increases food-related behavior and affect anxiety on a HFD and thus suggest a dietary rich in N-3 during this specific period in order to prevent changes in the neural circuitry regulating appetite and emotion that can promote weight gain in the context of a high-fat diet.

### **Acknowledgements**

This project was supported by a grant to SF from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (355881-2013), a CIHR grant (MOP9575) to CD and graduate awards to SA from the Department of Nutrition, Université de Montréal.

### **Conflict of Interest**

The authors have no conflict of interests to report.

## Figure Legends

### **Figure 1. Perinatal N-3 deficiency increases body weight and fat mass and decreases locomotor activity on a high-fat diet**

**A.** Body weight gain over course of 14 weeks on a chow or high-fat diet (HFD). **B.** Body weight of N-3 Def mice on a HFD, but not on chow diet, was increased at 20 weeks of age relative to N-3 Ad controls ( $p < .005$ ). **C.** Fat mass was significantly elevated in N-3 Def mice on the HFD ( $p < .0005$ ). **D.** Heightened lean mass of N-3 Def mice on chow diet ( $p < .005$ ). **E.** Cumulative food intake was similar between N-3 Def and N-3 Ad mice on chow or HFD (main effect of HFD,  $p < .0001$ ). **F.** N-3 mice on the HFD exhibited reduced locomotor activity (main effect of N-3,  $p < .05$ ). Mean  $\pm$  SEM. Pairwise effects: \* $p < .05$ ; \*\* $p < .005$ .

### **Figure 2. Tendency for heightened sucrose-motivated behaviour in N-3 def mice**

**A.** Operant learning on an FR1 schedule was similar between N-3 Def and N-3 Ad mice. **B.** The proportion of correct versus incorrect lever presses was unchanged. **C.** Trend towards increased number of sucrose rewards earned on the PR schedule of reinforcement in N-3 Def mice ( $p = .08$ ). Mean  $\pm$  SEM.

### **Figure 3. N-3 deficiency increases anxiety-like behaviour in the open-field test**

**A.** N-3 deficiency ( $p < .05$ ) and HFD ( $p < .05$ ) reduced the number of entries into the center of the open field. There was no interaction between diets. **B.** The amount of time spent in the center of the open field was reduced by N-3 Def ( $p < .05$ ) and HFD ( $p < .05$ ). There was no interaction between diets. **C.** There was a main effect of the HFD to reduce the number of entries into the open arm ( $p < 0.0001$ ) of the EPM but N-3 deficiency did not affect the number of open arm entries. **D.** No influence of either diet on time spent in the open arms of the EPM. Mean  $\pm$  SEM



**Table 1.** Diet composition

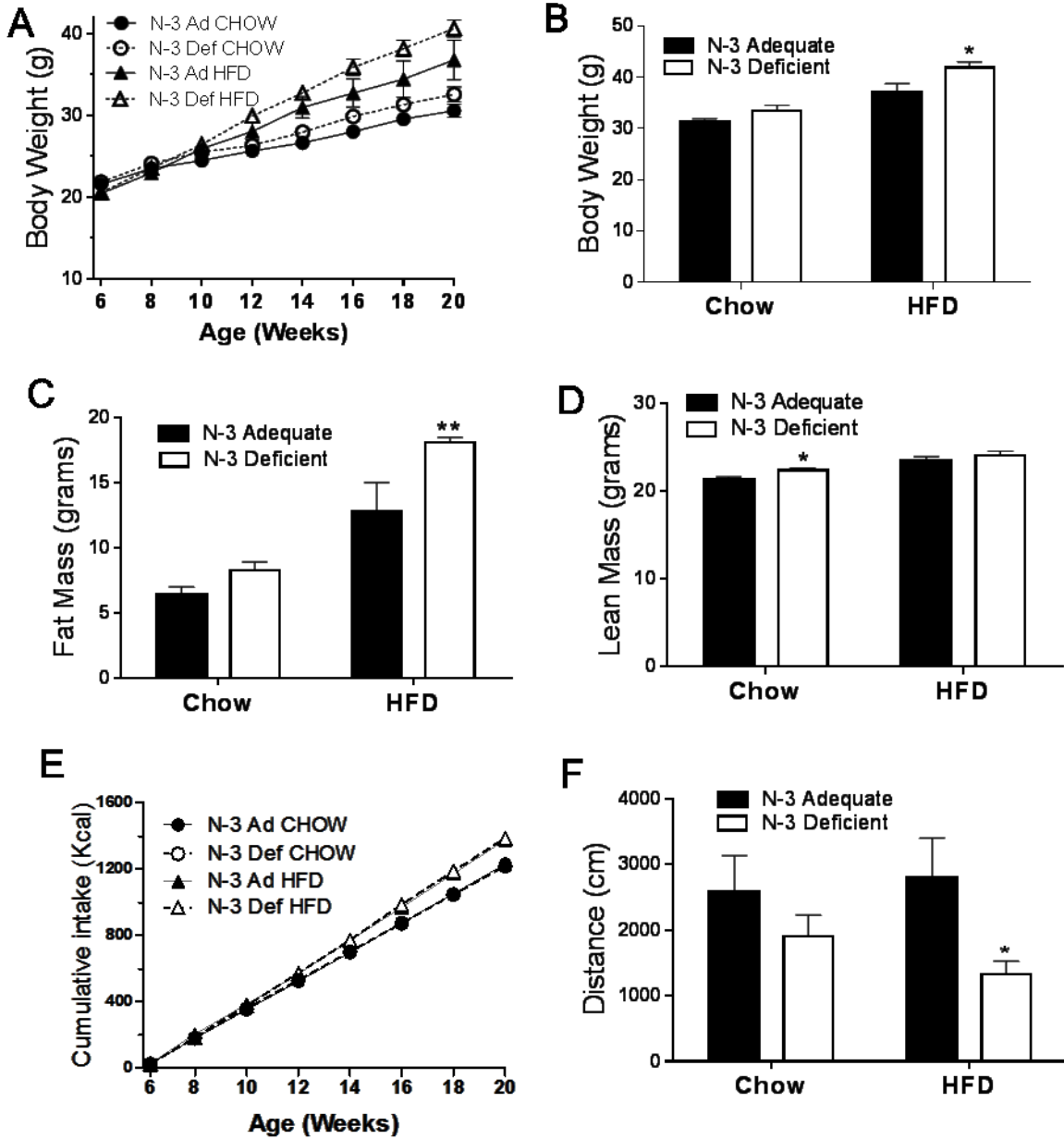
<b>Ingredients</b>	<b>N-3 Adequate (g/kg)</b>	<b>N-3 Deficient (g/kg)</b>
Vit. (No Casein)	200	200
L-cystine	3	3
Cornstarch	150	150
Sucrose	100	100
Dextrose	199.48	199.48
Maltose Dextrin	150	150
Cellulose	50	50
Safflower Oil	17.7	19
Coconut oil	74.99	81
<b>DHA (from algae)</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
TBHQ	0.02	0.02
Vitamins	10	10
Choline Bitartrate	2.5	2.5
<b>Flaxseed Oil</b>	<b>4.81</b>	<b>0</b>
Minerals	35	35
Kcal/g	3.9	3.9
<b>Total</b>	<b>1000.00</b>	<b>1000.00</b>

**Table 2. Brain polyunsaturated fatty acid profile**

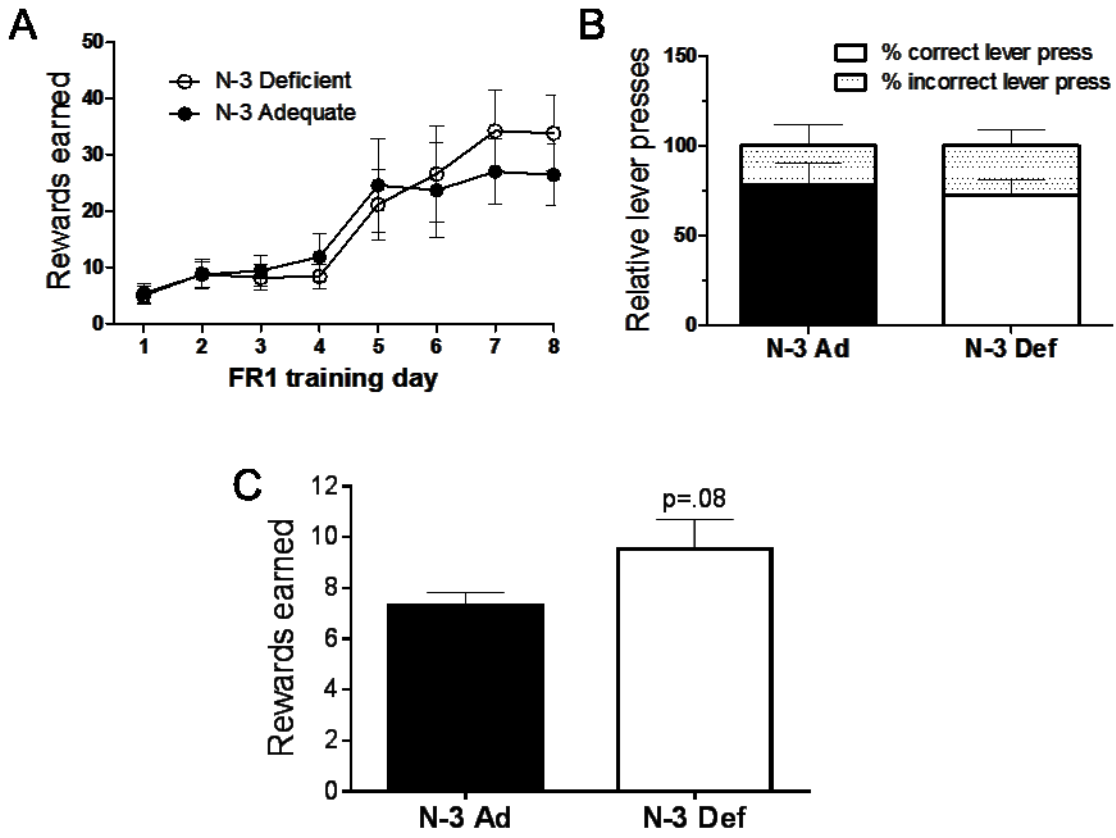
<b>Fatty Acid</b>	<b>N-3 Ad</b>	<b>N-3 Def</b>	<b>P value</b>
DPA C22:5n3	0.051	0.035	*
EPA C20:5n3	0.018	0.0018	***
DHA C22:6n3	23.79	19.96	0.09
Total n-3	23.9	18.74	0.09
AA C20:4n6	11.40	15.27	**
Total n-6	12.22	15.48	**
Ratio DHA/AA	2.10	1.26	**
Ratio n-3/n-6	2.07	1.33	**

DPA, docosapentaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid; AA, arachidonic acid; n-3, omega-3 polyunsaturated fatty acid; n-6, omega-6 polyunsaturated fatty acid. Values are expressed as mean percentage of total fatty acid  $\pm$  SEM; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001

**Figure 1**

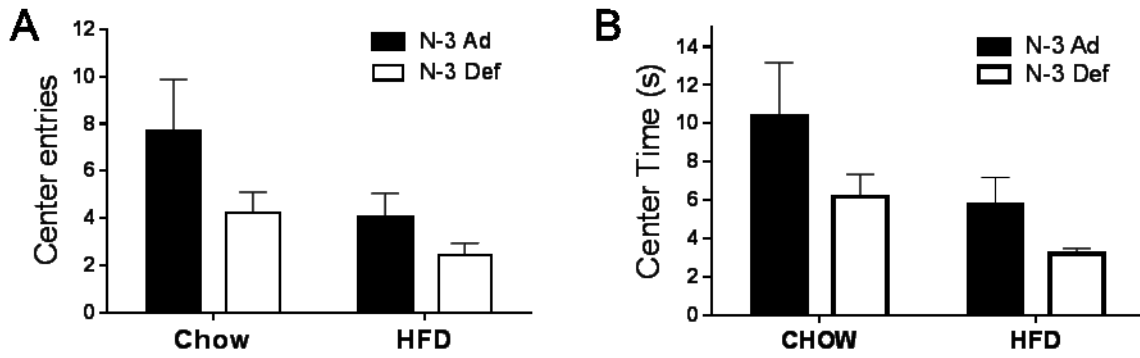


# Figure 2

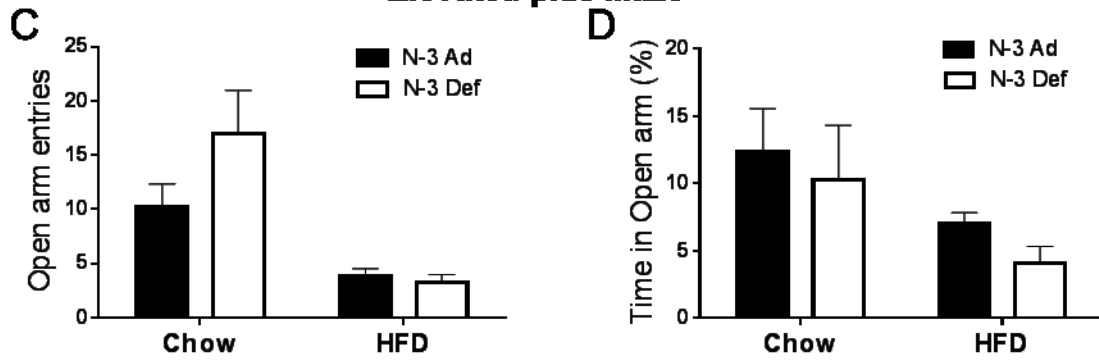


# Figure 3

## Open field test

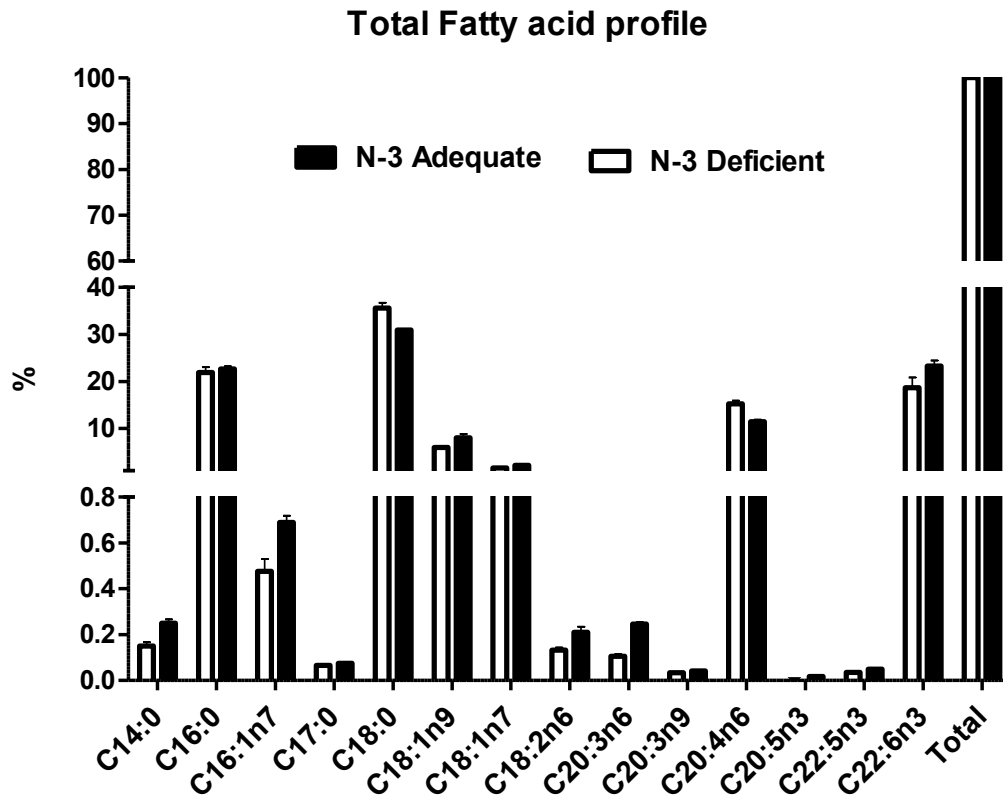


## Elevated-plus maze



Supplementary Figure 1. Whole brain fatty acid profile of N-3 Def and N-3 Ad female mice.

Figure S1



## References

1. Simopoulos, A.P., *Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1999. **60**(5-6): p. 421-9.
2. Simopoulos, A.P., *The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids*. Biomedicine & Pharmacotherapy Biomedicine & Pharmacotherapy, 2002. **56**(8): p. 365-379.
3. Catalan, J., et al., *Cognitive deficits in docosahexaenoic acid-deficient rats*. Behav Neurosci, 2002. **116**(6): p. 1022-31.
4. Ikemoto, A., et al., *Reversibility of n-3 fatty acid deficiency-induced alterations of learning behavior in the rat: level of n-6 fatty acids as another critical factor*. J Lipid Res, 2001. **42**(10): p. 1655-63.
5. McNamara, R.K., et al., *Selective Deficits in the Omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid in the Postmortem Orbitofrontal Cortex of Patients with Major Depressive Disorder*. Biol Psychiatry, 2007. **62**(1): p. 17-24.
6. Shaldubina, A., B. Nemets, and Y. Bersudsky, *Lack of effect of eicosapentaenoic acid in the Porsolt forced swimming test model of depression*. Acta Neuropsychiatrica. Officieel Wetenschappelijk Orgaan van Het IGBP (Interdisciplinair Genootschap voor Biologische Psychiatrie), 2002. **14**(5): p. 203-206.
7. Sontrop, J., et al., *Depressive symptoms during pregnancy in relation to fish consumption and intake of n-3 polyunsaturated fatty acids*. Paediatric and Perinatal Epidemiology, 2008. **22**(4): p. 389-399.
8. Sharma, S., M. Fernandes, and S. Fulton, *Adaptations in brain reward circuitry underlie palatable food cravings and anxiety induced by high-fat diet withdrawal*. International journal of obesity, 2013. **37**(9): p. 1183-1191.
9. Sharma, S. and S. Fulton, *Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry*. Int J Obes (Lond), 2012. **48**.
10. Hryhorczuk, C., et al., *Dampened mesolimbic dopamine function and signaling by saturated but not monounsaturated dietary lipids*. Neuropsychopharmacology, 2015.
11. Volkow, N.D., G.-J. Wang, and R.D. Baler, *Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity*. Trends in cognitive sciences, 2011. **15**(1): p. 37-46.
12. Francis, H. and R. Stevenson, *The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain*. Appetite, 2013. **63**: p. 119-28.
13. Luppino, F.S., et al., *Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies*. Arch Gen Psychiatry, 2010. **67**(3): p. 220-9.
14. Sellbom, K.S. and J. Gunstad, *Cognitive function and decline in obesity*. J Alzheimers Dis, 2012. **30 Suppl 2**: p. S89-95.
15. Sharma, S. and S. Fulton, *Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry*. International journal of obesity (2005), 2013. **37**(3): p. 382-9.
16. Edwards, R., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients*. Journal of Affective Disorders, 1998. **48**(2-3): p. 149-155.

17. Suzuki, H., et al., *Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acid composition of brain stem phospholipids and synaptic membrane fluidity in adult mice: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet*. Mech Ageing Dev, 1998. **101**(1-2): p. 119-28.
18. McNamara, R.K. and S.E. Carlson, *Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology*. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 2006. **75**(4-5).
19. Rao, J.S., et al., *n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism*. Mol Psychiatry, 2007. **12**(1): p. 36-46.
20. Akbar, M., et al., *Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 10858-63.
21. Wu, A., Z. Ying, and F. Gomez-Pinilla, *Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats*. Journal of neurotrauma, 2004. **21**(10): p. 1457-1467.
22. Velloso, L.A. and E.P. Araújo, *Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity*. Neuroimmunomodulation, 2008. **15**(3): p. 189-93.
23. Riediger, N.D., et al., *A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease*. Journal of the American Dietetic Association, 2009. **109**(4): p. 668-679.
24. Gélinas, R., et al., *Prolonged QT interval and lipid alterations beyond  $\beta$ -oxidation in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase null mouse hearts*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2011. **301**(3): p. H813-H823.
25. Sharma, S., C. Hryhorczuk, and S. Fulton, *Progressive-ratio Responding for Palatable High-fat and High-sugar Food in Mice*. JoVE, 2012(63): p. 3754.
26. Extier, A., et al., *Gender affects liver desaturase expression in a rat model of n-3 fatty acid repletion*. The Journal of nutritional biochemistry, 2010. **21**(3): p. 180-7.
27. Simopoulos, A.P., *Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development*. The American journal of clinical nutrition, 1991. **54**(3): p. 438-63.
28. Frances, H.M.C.B.J.M., *Effects of Dietary Alpha-Linolenic Acid Deficiency on Neuromuscular and Cognitive Functions in Mice*. LIFE SCIENCES, 1995. **57**(21): p. 1935.
29. Morton, G., et al., *Central nervous system control of food intake and body weight*. Nature, 2006. **443**(7109): p. 289-295.
30. Saper, C.B., T.C. Chou, and J.K. Elmquist, *The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating*. Neuron, 2002. **36**(2): p. 199-211.
31. Berthoud Hr, Z.H.S.A.C., *Food reward in the obese and after weight loss induced by calorie restriction and bariatric surgery*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2012. **1264**: p. 36-48.
32. Stice, E., et al., *Relation of obesity to consummatory and anticipatory food reward*. Physiology & behavior, 2009. **97**(5): p. 551-60.
33. Narayanan N.S, G.D.J.D.R.J., *Metabolic hormones, dopamine circuits, and feeding*. Front. Neuroendocrinol. Frontiers in Neuroendocrinology, 2010. **31**(1): p. 104-112.
34. Salamone, J.C.M.F.A.M.S., *Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits*. Psychopharmacology, 2007. **191**(3): p. 461-482.



35. Salamone, J.D., *Will the last person who uses the term 'reward' please turn out the lights? Comments on processes related to reinforcement, learning, motivation and effort.* *Addiction biology*, 2006. **11**(1): p. 43-4.
36. Carlin, J., et al., *Reversal of dopamine system dysfunction in response to high-fat diet.* *OBY Obesity*, 2013. **21**(12): p. 2513-2521.
37. Calder, P.C., *Polyunsaturated fatty acids and inflammation.* *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 2006. **75**(3): p. 197-202.
38. Orr Sk, B.R.P., *The emerging role of docosahexaenoic acid in neuroinflammation.* *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*, 2008. **9**(7): p. 735-43.
39. De Souza, C.T., et al., *Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus.* *Endocrinology*, 2005. **146**(10): p. 4192-4199.
40. Auguste S., F.A., Fernandes M, Hryhorczuk C., Poitout V., Alquier T., Fulton S., *Central agonism of GPR120 / FFAR4 inhibits food intake, food reward and anxiety-like behaviour.* *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 2016(In revision).
41. Emken, E.A., et al., *Effect of dietary docosahexaenoic acid on desaturation and uptake in vivo of isotope-labeled oleic, linoleic, and linolenic acids by male subjects.* *Lipids*, 1999. **34**(8): p. 785-91.
42. Jacka, F.N., et al., *The association between habitual diet quality and the common mental disorders in community-dwelling adults: the Hordaland Health study.* *Psychosomatic medicine*, 2011. **73**(6).

Les interventions diététiques qui visent à accroître les effets thérapeutiques des acides gras polyinsaturés ne sont pas concluants, puisque les concentrations circulantes d'ADH ne sont pas suffisamment élevées pour fournir une réponse durable et profonde. Cependant, l'activation pharmacologique des récepteurs d'acides gras libres par des agonistes a été démontrée et peut être une voie prometteuse pour le traitement des maladies métaboliques. La présente étude démontre qu'un agoniste synthétique de GPR120 administré dans le cerveau, peut induire un effet aigu et majeur sur les comportements liés à l'alimentation chez les rongeurs.

**Chapitre 4: Central agonism of GPR120 inhibits food intake and food reward and chronically suppresses anxiety-like behavior in mice**

**Title: Central agonism of GPR120 inhibits food intake and food reward and chronically suppresses anxiety-like behavior in mice**

**Auteurs:** Stéphanie Auguste\*, Alexandre Fiset, Maria F. Fernandes, Vincent Poitout, Thierry Alquier and Stephanie Fulton

Article publié dans le journal International Journal of Neuropsychopharmacology, 17 Février 2016

**Contribution des auteurs:**

**Stéphanie Auguste :** Auteure principale. A élaboré les hypothèses, conçu et réalisé les expériences, a analysé les données et rédigé le manuscrit.

**Alexandre Fiset :** Coauteur a participé à la correction du manuscrit.

**Maria F. Fernandes :** Coauteur a participé à la manipulation du système CLAMS pour obtenir les données de dépenses énergétiques.

**Cécile Hryhorczuk :** Coauteur a réalisé la quantification d'ARN du GPR120 cérébral.

**Dr Vincent Poitout :** Coauteur et collaborateur. Contribution intellectuelle.

**Dr Thierry Alquier :** Coauteur et collaborateur. Contribution intellectuelle.

**Dr Stephanie Fulton :** Directrice de thèse. A dirigé tout le projet et rédigé le manuscrit.

**Central agonism of GPR120 inhibits food intake and  
food reward and chronically suppresses anxiety-like behavior in mice**

Stéphanie Auguste MD.<sup>1,2</sup>, Alexandre Fiset PhD.<sup>1,2</sup>, Maria F. Fernandes PhD.<sup>1,3</sup>, Cécile Hryhorczuk M.Sc.<sup>1,3</sup>, Vincent Poitout PhD.<sup>1,4</sup>, Thierry Alquier PhD.<sup>1,4</sup> and Stephanie Fulton PhD.<sup>1,2</sup>

1-Centre de Recherche du CHUM & Montreal Diabetes Research Center; Departments of: 2-Nutrition, 3-Physiology and 4-Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, QC, Canada

Running title: GPR120, appetite and anxiety

Category: Regular research article

Word count Abstract: 249

Word count Manuscript body: 3235

Number of references: 41

Number of figures: 5

Number of tables: 0

## Abstract

**Background:** GPR120 (FFAR4) is a G-protein coupled receptor implicated in the development of obesity and in the anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects of omega-3 ( $\omega$ -3) polyunsaturated fatty acids (PUFA) in peripheral tissues. Increasing central  $\omega$ -3 PUFA levels has been shown to have both anorectic and anxiolytic actions. Despite the strong clinical interest in GPR120 its role in the brain is largely unknown, and thus we sought to determine the impact of central GPR120 pharmacological activation on energy balance, food reward and anxiety-like behavior.

**Methods:** Male C57Bl6 mice with intracerebroventricular cannulae received a single injection (0.1 or 1 $\mu$ M) or continuous 2-week infusion (1 $\mu$ M/day; osmotic mini-pump) of a GPR120 agonist or vehicle. Free-feeding intake, operant lever-pressing for palatable food, energy expenditure (indirect calorimetry) and body weight were measured. GPR120 mRNA expression was measured in pertinent brain areas. Anxiety-like behavior was assessed in the elevated-plus maze and open field test.

**Results:** GPR120 agonist injections substantially reduced chow intake during four hours post-injection, suppressed the rewarding effects of high-fat/sugar food, and blunted approach-avoidance behavior in the open field. Conversely, prolonged central GPR120 agonist infusions reduced anxiety-like behavior in both the elevated-plus maze and open field test, yet failed to affect free-feeding intake, energy expenditure and body weight on a high-fat diet.

**Conclusion:** Acute reductions in food intake, food reward suggest that GPR120 could mediate the effects of central  $\omega$ -3 PUFA to inhibit appetite. The anxiolytic effect elicited by prolonged GPR120 agonist infusions favors the testing of compounds that cross the blood brain barrier to activate GPR120 for the mitigation of anxiety.

**Keywords:** GPR120, omega-3 polyunsaturated fatty acids, food reward, anxiety, energy metabolism

## **Introduction**

Obesity and mood disorders represent dominant sources of morbidity and disability. Anxiety disorders are the most common psychiatric condition in developed countries and their prevalence is significantly increased by the incidence of obesity (Garipey et al., 2010). Due to their persistent nature, anxiety disorders can be particularly debilitating by impairing not only well-being and quality of life but also intensifying the threat of obesity-related complications. Substantial research efforts have focussed on reducing the burden of obesity and associated illnesses, but results have been unsatisfying.

The search for treatments has prompted the study of free fatty acids and their signalling actions at G-protein-coupled receptors (GPCRs). Indeed, fatty acids are not only essential nutritional components but they also play an important role as signalling molecules that regulate metabolism and inflammation. Specific fatty acid receptors considered orphan GPCRs have been the subject of much recent investigation for their therapeutic potential (Cornall et al., 2013a, b; Yonezawa et al., 2013). Among these are GPR120 (FFAR4) and GPR40 (FFAR1) that are stimulated by long-chain fatty acids including omega-3 ( $\omega$ -3) polyunsaturated fatty acids (PUFA) (Itoh et al., 2003; Hirasawa et al., 2005). GPR120 loss-of-function in mice prevents the anti-inflammatory and insulin sensitizing actions of  $\omega$ -3 PUFA (Oh, 2010), decreases energy expenditure and increases high-fat diet (HFD)- induced weight gain (Ichimura et al, 2012), whereas variants in the human gene encoding GPR120 increase the risk of obesity (Ichimura et al., 2012) and fasting plasma glucose levels (Bonfond et al., 2015). Further, GPR120 agonism improves insulin resistance and inflammation in high-fat fed obese mice suggesting GPR120 as a promising anti-diabetes and -obesity target (Walenta et

al., 2014). GPR120 may affect appetite and food intake by regulating the secretion of gut hormones, such as GLP-1 (Tanaka et al., 2008; Paulsen et al., 2014), glucagon (Suckow et al., 2014), cholecystokinin (CCK) (Tanaka et al., 2008), and ghrelin (Lu et al., 2012; Engelstoft et al., 2013; Gong et al., 2014). Alternatively, GPR120 could affect feeding and energy balance via direct central actions, although the role of GPR120 in the central nervous system (CNS) is poorly understood.

Beyond their impact on energy balance, dietary  $\omega$ -3 PUFA are also well-implicated in the regulation of emotional states and pathophysiology of mood disorders. Decreasing brain content of  $\omega$ -3 PUFA via dietary deficiency enhances anxiety- and depressive-like behaviors (Shaldubina et al., 2002; McNamara et al., 2007; Sontrop et al., 2008), whereas  $\omega$ 3 dietary supplementation can have anxiolytic actions in rodent and primates (Fedorova and Salem, 2006; Ferraz et al., 2011; Languille et al., 2012). Moreover, saturated high-fat feeding, which can diminish brain  $\omega$ -3 PUFA concentrations (Phivilay et al., 2009), promotes anxiety-like behavior and greater stress sensitivity in mice (S Sharma and Fulton, 2012). The objective of the present study was to determine the role of brain GPR120 in the control of appetite, energy balance and anxiety-like behavior. Here we demonstrate that pharmacological activation of central GPR120 can have profoundly inhibit food intake and the rewarding effects of high-fat/sugar food on the short term and sustained actions to reduce anxiety-like behavior in high-fat fed mice.



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

All procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of the CRCHUM that adheres to the standards of the Canadian Council on Animal Care. Male C57Bl/6 mice (Charles River, St Constant, Canada) received at 7-8 weeks of age were maintained in an environmentally controlled room (22-24°C) with *ad libitum* access to standard chow and water. Mice were acclimated to a reverse light/dark cycle for at least 7 days before initiation of experiments and were individually housed following intracerebroventricular (ICV) cannula implantation. All behavioural testing was carried out in the dark phase.

### **ICV cannula and osmotic mini-pump implantation**

Mice were anaesthetized with Isoflurane and placed in an ultraprecise mouse stereotaxic apparatus (Kopf Instruments). For acute agonist treatment experiments a single ICV cannula was implanted. With Bregma and Lambda in the same horizontal plane, a cannula (Guide cannula: C315GS-5-SP, 5mm, 26 gauge, Plastics One) was lowered into the lateral ventricle (+0.5 mm caudal and +1mm lateral to bregma; -2 mm ventral), fixed to the skull with cyanoacrylate glue and Cerabond adhesive (Plastics One) and closed with an adapted dust cap (Dummy cannula: C315DCS-5-SPC, 4mm, 33 gauge, Plastics One). Five days following the surgery, the placement of cannulas was verified by the drinking response to an injection of Angiotensin II (10ng/μl; Sigma). For chronic agonist administration, ICV cannulae with an L-shaped adaptor (Alzet, 28 gauge, 3-5mm from skull surface) were attached to a primed 21-day osmotic mini-pump with a flow rate of 0.25μl/h (Alzet osmotic pump cat #1002) via polyethylene tubing that was prefilled with vehicle. Fluid movement through the assembly

was verified at the cannula tip prior to stereotaxic implantation as described above. The mini-pump was inserted underneath the skin and pushed into place between the scapulae.

## **Drugs**

The GPR120 agonist (GPR120 III) was purchased from Calbiochem (San Diego, CA). GPR120 III is a potent agonist of GPR120 ( $EC_{50} = 17 \text{ nM}$ ) that exhibits minor affinity for GPR40 ( $EC_{50} = 64.6 \text{ }\mu\text{M}$ ) and no activity toward short chain fatty acid receptors (Shimpukade et al., 2012). Despite the much reduced potency toward GPR40 of the GPR120 agonist, we also tested the central effects of the specific GPR40 agonist, TAK-875 (Selleckchem, TX, USA) (Negoro et al., 2012), on food intake. All drugs were dissolved in saline + 1% dimethylsulfoxide (DMSO).

## **Food intake**

The effects of acute ICV injections of GPR120 and GPR40 agonists on food intake were assessed. The 0.1 and  $1\mu\text{M}$  doses of GPR120 agonist selected correspond to those reported to inhibit formalin-induced pain upon ICV injection (Nakamoto et al., 2012). Via an internal injector cannula attached to a  $1\mu\text{l}$  Hamilton microsyringe, mice ( $N=11$ ) received  $1\mu\text{l}$  of vehicle (saline + 1% DMSO) on day 1 followed by  $0.1 \text{ }\mu\text{M}$  of the GPR120 agonist on day 3 and then  $1\mu\text{M}$  of GPR120 agonist on day 5 (one day recovery period between each injection). Three days later, the same mice were again injected with vehicle and then the GPR40 agonist ( $1\mu\text{M}$ ) two days later. Single-housed mice were initially habituated to bedding-free cages with absorbent padding (for accurate food intake measurements) prior to testing. ICV injections were performed in fed mice at the beginning of the dark cycle. Following injections chow food intake was measured at 1, 2, 4, 6, 12 and 24 hours post-injection.

### **Locomotor activity**

Mice were habituated to metabolic cages (Comprehensive Lab Animal Monitoring System “CLAMS”, Columbus, OH, USA) for 2 days prior to testing. Locomotor activity (X-Y-Z beambreaks) was measured for 12 hours following ICV injection of GPR120 agonist or vehicle.

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

Brain punches of all specified regions were obtained from 250- $\mu$ M frozen coronal sections. Tissues were further processed for mRNA extraction (TRIzol) and cDNA synthesis to perform quantitative PCR as described (Fernandes et al., 2015) using the following primer sequences:

$\beta$ -Actin, F: TTCTTGGGTATGGAATCCTGTGGCA;

R: ACCAGACAGCACTGTGTTGGCATA and GPR120,

F: AGAGGCTTACGCTGAGCTTG; R: TGGATCAAGATGAGGATG. Relative gene

expression was calculated using the  $\Delta\Delta$ CT method using  $\beta$ -Actin as the housekeeping gene.

### **Food-motivated behaviour**

Mice were trained to press an ultra-light retractable lever for food rewards (14mg high-fat, high-sucrose pellets, Bio-Serv) in mouse operant cages (Med Associates, Inc.) on a progressive ratio (PR) schedule of reinforcement as described previously (Sandeep Sharma et al., 2012). Briefly, mice were mildly food restricted in order to acquire the lever-pressing task on a fixed-ratio (FR)-1 followed by a FR5 and PR schedules of reinforcement. Mice were returned to *ad libitum* feeding conditions during PR training. Once stable responding on the PR schedule was achieved, mice were first tested in basal conditions without injection (Day 1) and then following injection of vehicle (Day 2) and the GPR120 agonist (1 $\mu$ g; Day 3). ICV

injections were given 1 h before testing. The number of active lever presses, rewards earned and the breakpoint ratio (last ratio successfully completed) were calculated by MedPC software (Med Associates, Inc).

#### **Anxiety: Elevated plus maze**

Mice were placed in the middle of the elevated-plus maze (EPM; Med Associates, Inc., St Albans, VT, USA) facing the open arm opposing the experimenter one hour following ICV injections. Movement in the maze was recorded and tracked for 5 min by an overhead video camera connected to a PC with Ethovision XT software. Mice with mini-pumps followed the same procedure but without injection prior to the test.

#### **Anxiety: Open field test**

The open field test was used as an additional measure of anxiety-like behaviour as previously described (S Sharma and Fulton, 2013). Briefly, each mouse was placed in the middle of the arena 1 hour after injection and allowed to explore the field. Time spent in the center of the arena, center entries, plus the time and frequency of stretched attend postures (body elongation - an important component of defensive behaviour in rodents) during the first 5 minutes of this test were used as measures of exploration that serve as indices of anxiety. Behavior was recorded and tracked by an overhead video camera connected to a PC with Ethovision XT software. Mice with mini-pumps followed the same procedure but without injection prior to the test.

#### **Mini-pump ICV infusions**

Mini-pumps delivered either vehicle or GPR120 agonist (1 $\mu$ M/day;  $\sim$ 42nM/hour) at a flow rate of 0.25 $\mu$ l/h into the lateral ventricle. Food intake and body weight measures began three days following cannula and mini-pump implantation. Mice initially fed a chow diet were

separated into three weight-matched groups (n=5-8/group): (1) Vehicle infusion on an ingredient-matched, low-fat diet (“LFD”; 4.07 kcal/gm, 10.5% kcal fat, 16.4% kcal protein, 73.1% kcal carbohydrates, D12328, Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ); (2) vehicle infusion on a high-fat diet (“HFD”; 5.56 kcal/gm: 58% kcal fat, 16.4% kcal protein, 25.5% kcal carbohydrates, D12331, Research Diets, Inc.), and (3) GPR120 agonist infusion on a HFD. Mice received their respective diet for 3 weeks.

### **Statistical analyses**

Statistics were calculated using GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA). The effects of agonists on short-term food intake were analysed by one-way ANOVAs with post-hoc Dunnett tests. Anxiety-like behavior following acute injection was assessed by two-tailed, paired t-tests. A two-way ANOVA with the Bonferroni post-tests was used for food intake, body weight and energy expenditure data whereas a one-way ANOVA plus Bonferroni post-tests was used for comparisons of anxiety-like behaviour following prolonged pump treatment. Data are presented as mean  $\pm$  SEM and  $p \leq 0.05$  was set as the criteria for statistical significance.

## **RESULTS**

### **Central GPR120 agonism inhibits food intake**

Food intake at 1, 2 and 4 hours post-injection was significantly decreased in chow-fed mice receiving an ICV bolus of the GPR120 agonist at each of the two doses as compared to controls (Fig. 1A). GPR120 agonist treatment elicited up to an 80% and 72% reduction in food intake at the first and second hour post-injection, respectively (Fig. 1A). ( $P < .001$ ) In contrast, the GPR40 agonist did not affect food intake at any time point (Fig. 1B). To determine if

central GPR120 stimulation affects ambulatory activity. To determine if central GPR120 stimulation affects ambulatory activity, we next examined basal locomotion. Agonist-injected mice exhibited a trend ( $P = .1$ ) for increased activity only during the first hour post-injection (Fig. 1C).

### **GPR120 is expressed in reward-related nuclei and influences food-motivated behaviour**

The consumption of rewarding, energy-dense food is a major factor contributing to overeating and the development obesity and associated anxiety-like behavior (Sharma and Fulton, 2013). First, we sought to determine if GPR120 is expressed in brain areas important for the control of food reward and mood in addition to its reported expression in the hypothalamus (Cintra et al., 2012). Consistent with previous reports, we found relatively high expression in the arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus. GPR120 mRNA levels were also comparatively elevated in the nucleus accumbens (NAc), a brain region well-implicated in motivation and food reward, with lesser and minimal expression in the hippocampus and ventral tegmental area (VTA), respectively (Fig. 2A). We next ascertained if central GPR120 agonism decreases the motivational effects of palatable food using an operant conditioning task in which mice press a lever to receive high-fat/sugar pellets on a PR schedule of reinforcement. Agonist treatment did not affect the proportion of active and inactive lever presses (Fig. 2B) suggesting there were no changes in operant learning; however, it substantially reduced the number of rewards earned (Fig. 2C,  $P < .0.5$ ) and breakpoint response thresholds (Fig. 2D,  $P < .0.5$ ) relative to vehicle-injected controls.

### **Central GPR120 agonism dampens conflict behavior**

In view of the anxiolytic actions associated with dietary  $\omega$ -3 PUFA (Kiecolt-Glaser et al., 2011; Chen and Su, 2012), we sought to determine if central GPR120 stimulation modulates

anxiety-like behaviour using two standard tests of anxiety: the elevated-plus maze (EPM) and the open field test (OFT). Acute agonist injection produced a trend ( $P = .01$ ) for increased time spent in the open arms of the EPM (Fig. 3A) without altering open arm entries (Fig. 3B). The amount of time spent in the center of the OFT and the number of center entries were not different between groups (Fig. 3C, D); however, the duration (Fig. 3E,  $P < .0.1$ ) and frequency (Fig. 3F,  $P < .0.1$ ) of stretch attend postures, classified as an approach-avoidance element of conflict behaviour (Grewal et al., 1997), in the OFT were substantially reduced in agonist-injected mice relative to controls.

### **Prolonged central GPR120 agonism fails to affect energy balance on a high-fat diet**

Administration of a GPR120 oral agonist was recently reported to have greater metabolic actions in the context of a HFD (Walenta et al., 2014), thus we next assessed the effects of prolonged central agonist infusion on energy balance parameters in high-fat fed mice. Free-feeding intake, body weight, respiratory exchange and locomotor activity were measured in mice with osmotic mini-pumps connected to ICV cannula that delivered either the GPR120 agonist or vehicle for 15 days. As shown in Figure 4A, exposure to the HFD increased caloric intake relative to chow-fed controls as expected (day 11–15:  $P < .05$ ); however, food intake on the HFD was similar between agonist and vehicle-treated mice. Likewise, body weight increased on HFD but weight gain was similar between groups (Fig. 4B). Consistent with greater utilization of lipids, the respiratory exchange ratio (RER) measured 2 weeks following the pump infusions decreased with HFD ( $P < .01$ ), yet was comparable between agonist- and vehicle-treated HFD mice (Fig. 4C). Finally, locomotor activity that was measured in parallel with RER was similar across groups (Fig. 4D).

### **Prolonged central GPR120 activation inhibits anxiety-like behavior on a high-fat diet**

Anxiety-like behavior was assessed in the EPM and OFT following mini-pump infusions. As shown in Figure 5A, GPR120 agonist infusion reduced the time spent in the open arms of the EPM without changing open arm entries (Fig. 5B,  $P < .05$ ). Similarly, the amount time spent in the center of the OFT was significantly decreased in agonist-treated mice (Fig. 5C,  $P < .05$ ) without any changes in center entries (Fig. 5D). There were no differences in the stretch attend posture measure of conflict behaviour between groups (Fig. 5E, F). Finally, to determine if high-fat feeding and prolonged GPR120 agonism alters GPR120 expression, we evaluated mRNA expression in the NAc and mediobasal hypothalamus (region including ARC, ventromedial hypothalamus, and dorsomedial hypothalamus), two brain regions in which we found relatively higher GPR120 expression. No differences were found between group despite a tendency for HFD to decrease GPR120 expression and for the agonist to increase it

### **Discussion**

Several lines of evidence implicate GPR120 in the regulation of energy homeostasis including the control of glycemia and gut hormone secretion (Ulven and Christiansen, 2015). Here we demonstrate the consequences of acute and chronic central GPR120 stimulation on appetite, energy expenditure and anxiety. In addition to eliciting a sizeable reduction in food intake, acute stimulation of GPR120 potently decreased the motivational and rewarding effects of palatable food and blunted approach-avoidance conflict behavior. Chronic central infusions of the agonist in the context of high-fat feeding produced more robust anxiolytic effects yet failed to affect free-feeding intake, energy expenditure and body weight on a high-fat diet. Collectively, these results demonstrate the anxiolytic actions of central pharmacological



GPR120 stimulation and reveal its central appetite-suppressing effects, which may be limited to transient receptor activation.

A limitation of our study is the use of a GPR120 agonist that weakly binds to GPR40. However, as central administration of a GPR40 specific agonist did not affect food intake, the strong anorectic effects observed are likely attributable to GPR120 activation. The anorectic effect of central GPR120 stimulation is consistent with reports that  $\omega$ -3 PUFA including docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic, but not saturated fatty acids, decrease food intake when administered centrally (Velloso and Araújo, 2008; Schwinkendorf et al., 2011). This raises the possibility that  $\omega$ -3 PUFA inhibit feeding by targeting GPR120 in brain regions important for controlling food intake. Correspondingly, we found *GPR120* mRNA to be expressed at relatively high levels in the ARC nucleus of the hypothalamus, a finding that coincides with observations of GPR120 protein expression in ARC neuropeptide-Y neurons (Cintra et al., 2012). Moreover, acute ICV injections of PUFA increased GPR120 association with  $\beta$ -arrestin-2, a GPCR regulatory protein that directly couples to GPR120 (Talukdar et al., 2011), in the hypothalamus (Cintra et al., 2012). We also noted relatively elevated levels of *GPR120* in the NAc, a key brain site controlling motivation and goal-directed behavior for food. In line with these data, we extended the appetite-suppressing effects of central GPR120 agonist treatment to decreased motivation to obtain palatable high-fat and sugar food using an operant task. Thus, apart from the implication of GPR120 in the stimulation of gut hormones that can modulate feeding, our data suggest that direct activation of central GPR120 can reduce appetite, in part, by suppressing the rewarding effects of palatable food. Future studies are required to determine if decreased food-motivated behavior by GPR120 occurs via signaling actions in the NAc.

Contrary to the impact of acute GPR120 activation on food intake, we did not detect changes in feeding in high-fat fed mice receiving prolonged agonist treatment. High-fat feeding increased caloric intake, body weight and respiratory exchange (consistent with increased lipid utilization) as expected, but continuous central GPR120 infusions did not affect these parameters or locomotor activity. In contrast, chronic GPR120 agonist infusion reduced anxiety-like behavior in two standardized tests, having a great anxiolytic impact compared with the discrete effect on approach-avoidance behavior observed following acute agonist treatment. Thus, the anxiolytic actions of central GPR120 agonism require sustained or cumulative stimulation of GPR120. Consistent with these anxiolytic actions, we found that GPR120 is expressed in nuclei such as the NAc that are well implicated in the control of emotional processes and mood (Russo and Nestler, 2013). No significant differences were observed in GPR120 gene expression with high-fat feeding and agonist treatment due to highly variable expression levels in the LFD group. Nonetheless, the tendency for GPR120 in the NAc and mediobasal hypothalamus to decrease in HFD mice and approach LFD levels after agonist infusions argues for further analyses of expression patterns under different dietary conditions

A possible explanation for the lack of maintained anorectic effects with prolonged GPR120 stimulation could be the presence of counter-regulatory mechanisms that offset catabolic conditions to maintain energy homeostasis. An alternative possibility involves GPR120 desensitization. Desensitization of GPCRs and decreased responsiveness to agonists has been noted in several systems and involves reduced binding of  $\beta$ -arrestins (Pitcher et al., 1998). As noted above, the anorectic effects of ICV  $\omega$ -3 PUFA injections have been linked to the GPR120 activation and association with  $\beta$ -arrestin-2 (Cintra et al., 2012); however, long-

term treatment and receptor binding may lead to GPR120 resistance. Indeed, HFD consumption is unchanged in GPR120 knockout mice (Ichimura et al., 2012). Moreover, while body weight on a HFD was found to be elevated in one study of GPR120 knockout mice (associated with decreased energy expenditure; (Ichimura et al., 2012)), others report no changes in body weight following GPR120 gene deletion (Oh, 2010) or with prolonged treatment of a GPR120 oral agonist (Walenta et al., 2014). Therefore, it appears that continuous peripheral and central activation GPR120 has little impact on feeding and body weight under free-feeding conditions.

The anxiolytic actions of prolonged central GPR120 stimulation suggest that potential GPR120 desensitization does not affect this behavioral function. These findings could suggest that distinct signaling mechanisms may mediate GPR120 action on feeding vs anxiety. The antiinflammatory effects and benefits of the GPR120 activation by  $\omega$ -3 PUFA involve several mechanisms, including inhibition of the NF $\kappa$ B pathway by  $\beta$ -arrestin (Oh et al., 2010); the activation of phospholipase A2, which releases  $\omega$ -3 PUFA (docosahexaenoic acid and EPA) esterified in membrane phospholipids (Im, 2012); and induction of enzyme stearoyl-CoA desaturase-1 generating monounsaturated fatty acids (Ichimura et al., 2012). Central inflammatory processes have been repeatedly implicated in the etiology of mood disorders, and the beneficial influence of  $\omega$ -3 dietary supplementation on emotional states has been linked to anti-inflammatory actions in the CNS (Hayley et al., 2005; Miller et al., 2009; Rosenblat et al., 2014). Indeed, GPR120 was recently identified as having antiinflammatory properties in neural cell lines (Wellhauser and Belsham, 2014). GPR120 is highly expressed in peripheral macrophages and may therefore also localize to brain macrophages (notably microglia) to modulate inflammatory processes, including those altered by  $\omega$ -3 PUFA.

Although purely speculative, it is possible that the anxiolytic actions of chronic GPR120 activation implicate distinct antiinflammatory signaling pathways in brain microglia that are not subject to GPR120 desensitization.

Targeting fatty acid receptors has been proclaimed a promising avenue to pharmaceutically treat metabolic diseases. The present study demonstrates that a GPR120 agonist delivered to the brain can have enduring effects to suppress anxiety-like behavior and thus suggest GPR120 as potential pathway through which  $\omega$ -3 PUFA have central anxiolytic actions. An emerging element in the treatment of obesity is its strong link with mood disorders and the advantages of an integrated therapeutic approach. The concept of a multi-target strategy is developing and consists of simultaneously producing beneficial effects on energy balance and mood. A GPR120 agonist that can cross the blood brain barrier offers the advantage of this poly-target approach. In combination with the reported insulin sensitizing actions of GPR120 activation, our data favour testing of compounds that cross the blood brain barrier to target GPR120 and/or downstream effectors for the treatment of anxiety.

### **Acknowledgments**

This project was supported by a *Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC)* grant to SF, a *Canadian Institutes of Health Research (CIHR)* New Investigator salary awards to SF, a salary award to TA from the *Fonds de Recherche du Québec Santé (FRQS)*, post-doctoral and doctoral fellowships from the *Canadian Diabetes Association* to AF and MF, respectively, and awards from the *International Atomic Energy Association* and Department of Nutrition, Université de Montréal to SA. VP holds the *Canada Research Chair* in Diabetes and Pancreatic Beta-Cell Function.

## Statement of Interest

None

## Figure Legends

### **Figure 1. Central injection of a GPR120 agonist inhibits food intake**

**A.** Cumulative food intake following acute central agonist injection. The 0.1 and 1  $\mu\text{M}$  dose significantly suppressed chow intake at 1 and 2 hours post-injection. **B.** A selective GPR40 agonist (1 $\mu\text{M}$ ) did not influence food intake. **C.** A single ICV injection of the GPR120 agonist had no overall effect on locomotor activity, however it produced a trend ( $p=0.1$ ) for increased increases ambulatory activity during the first hour post-injection. Mean  $\pm$  SEM \* $p<.05$ .

### **Figure 2. Central GPR120 agonism inhibits the rewarding effect of food**

**A.** GPR120 mRNA expression in the arcuate nucleus (ARC), ventral tegmental area, hippocampus and the nucleus accumbens (NAc). **B.** Central injection of the GPR120 agonist (1 $\mu\text{M}$ ) did not impair operant learning. Proportion of correct and incorrect lever responses. **C.** GPR120 agonism reduced the number of high-fat/sucrose pellet rewards on PR schedule of reinforcement as compared to vehicle treatment. Vehicle treatment did not alter rewards earned relative to baseline testing. **D.** Breakpoint response thresholds in the PR task were suppressed by GPR120 agonist injection. Mean  $\pm$  SEM \* $p<.05$ .

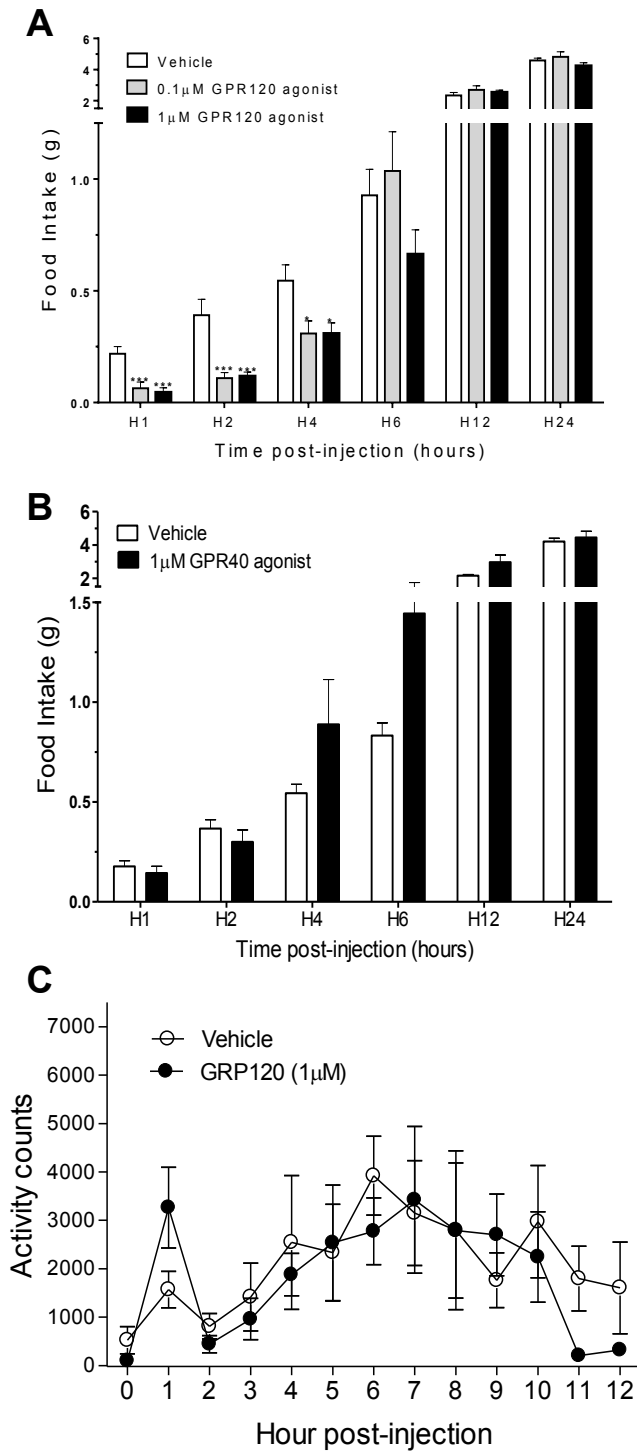
### **Figure 3. GPR120 agonist dampens signs of anxiety-like behaviour**

**A.** GPR120 agonist (1 $\mu$ M) injection produces a trend ( $p=0.1$ ) for increased time spent in the open arms of the EPM. **B.** GPR120 agonist did not alter open arm entries in the EPM. **C.** The proportion of time spent the center of the open field was unchanged. **D.** The number of center entries in the open field was not different. **E.** The duration of stretch attend postures (elongation) was suppressed by the agonist. **F.** The frequency of stretch attend postures was inhibited by the agonist. Mean  $\pm$  SEM \*\* $p<.01$ .

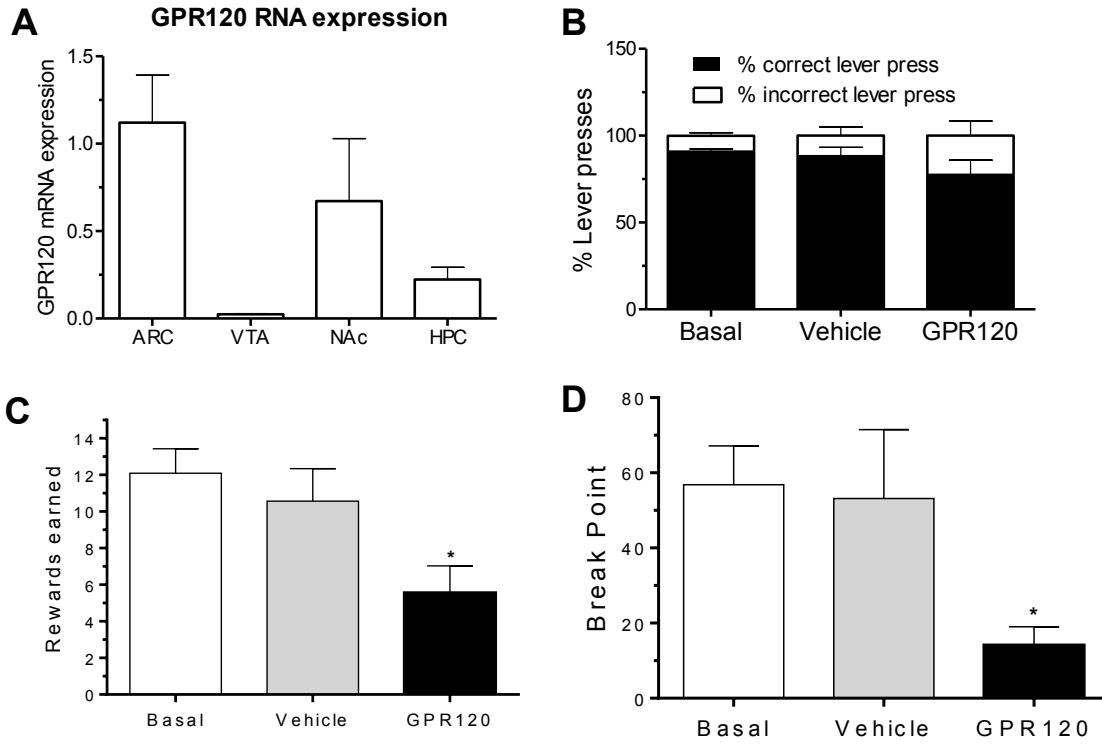
**Figure 4. Chronic GPR120 administration does not affect food intake, body weight or energy expenditure.** **A.** Two-week central GPR120 agonist infusions (1 $\mu$ M/day) did not affect HFD consumption. HFD increased caloric intake relative to LFD controls. **B.** GPR120 agonist infusions did not modulate body weight in high-fat fed mice. **C.** The respiratory exchange ratio (RER) was not altered by agonist infusions; however RER was increased by HFD relative to LFD consistent with greater lipid utilization. **D.** Locomotor activity was unchanged by agonist infusions and HFD. Mean  $\pm$  SEM.

**Figure 5. Prolonged central GPR120 agonist infusions reduce anxiety-like behavior.** **A.** Mice receiving the GPR120 agonist spent more time in the open arms of the EPM relative to HFD controls. **B.** Open arm entries in the EPM were not significantly different between groups. **C.** Proportion of time spent in the center of the open field was increased in HFD mice receiving the GPR120 agonist relative to HFD mice receiving vehicle. **D.** The number of center entries was unchanged across groups. **E.** Duration of stretch attends posture was not different between groups. **F.** Frequency of stretch attends postures was unchanged between groups. Mean  $\pm$  SEM \* $p<.05$ .

**Figure 1**

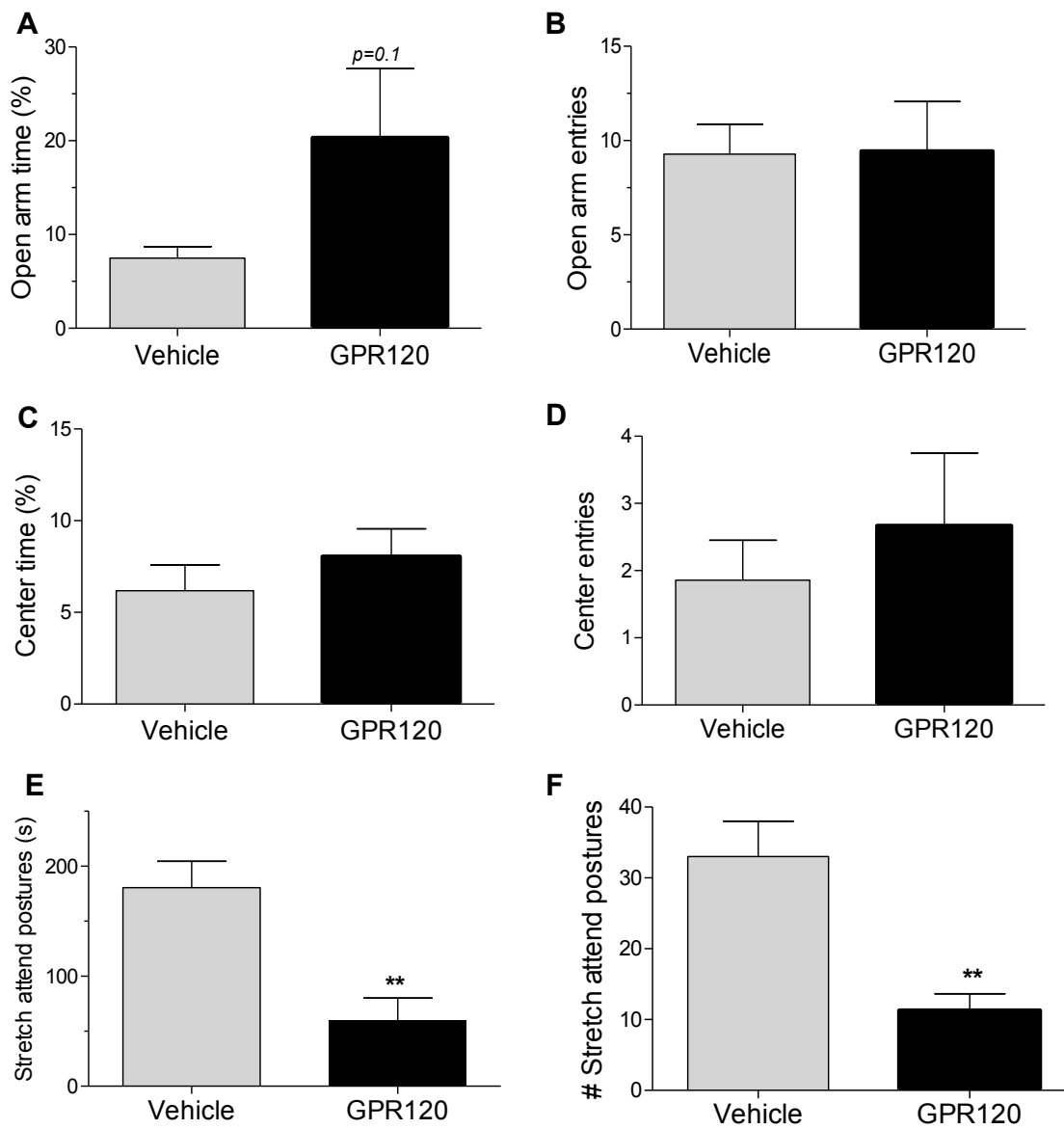


# Figure 2

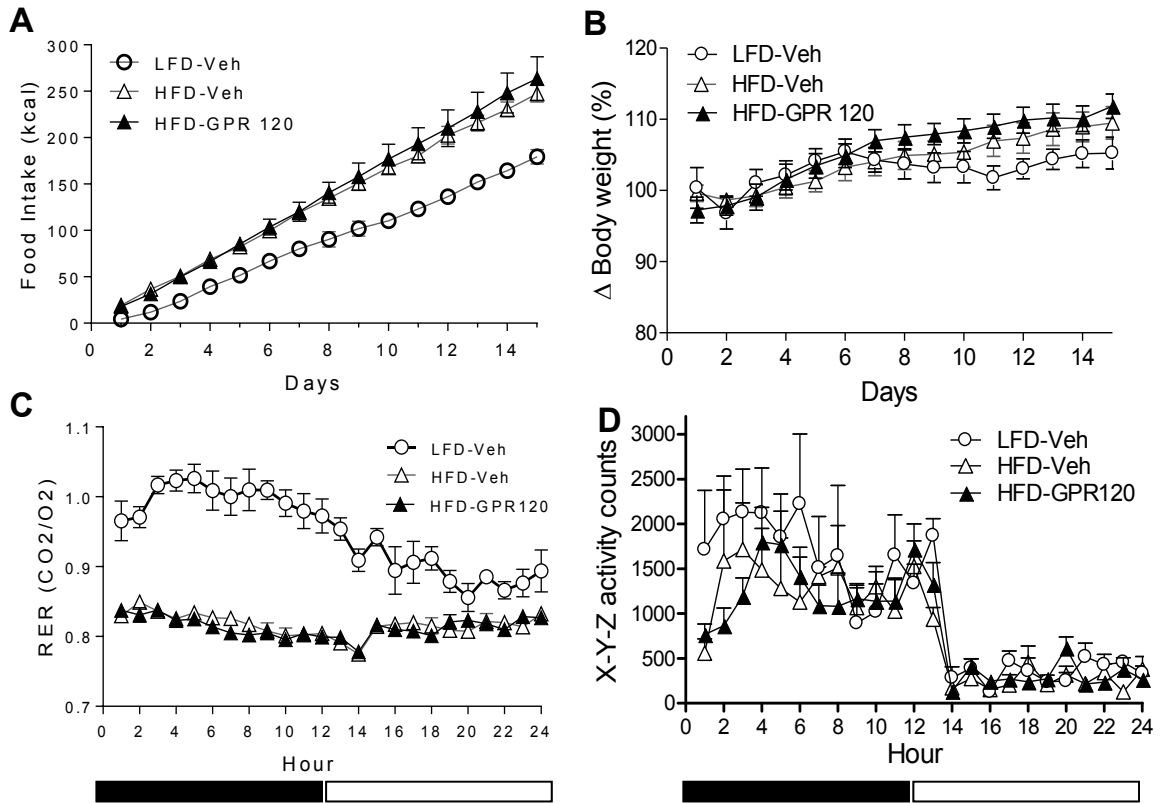




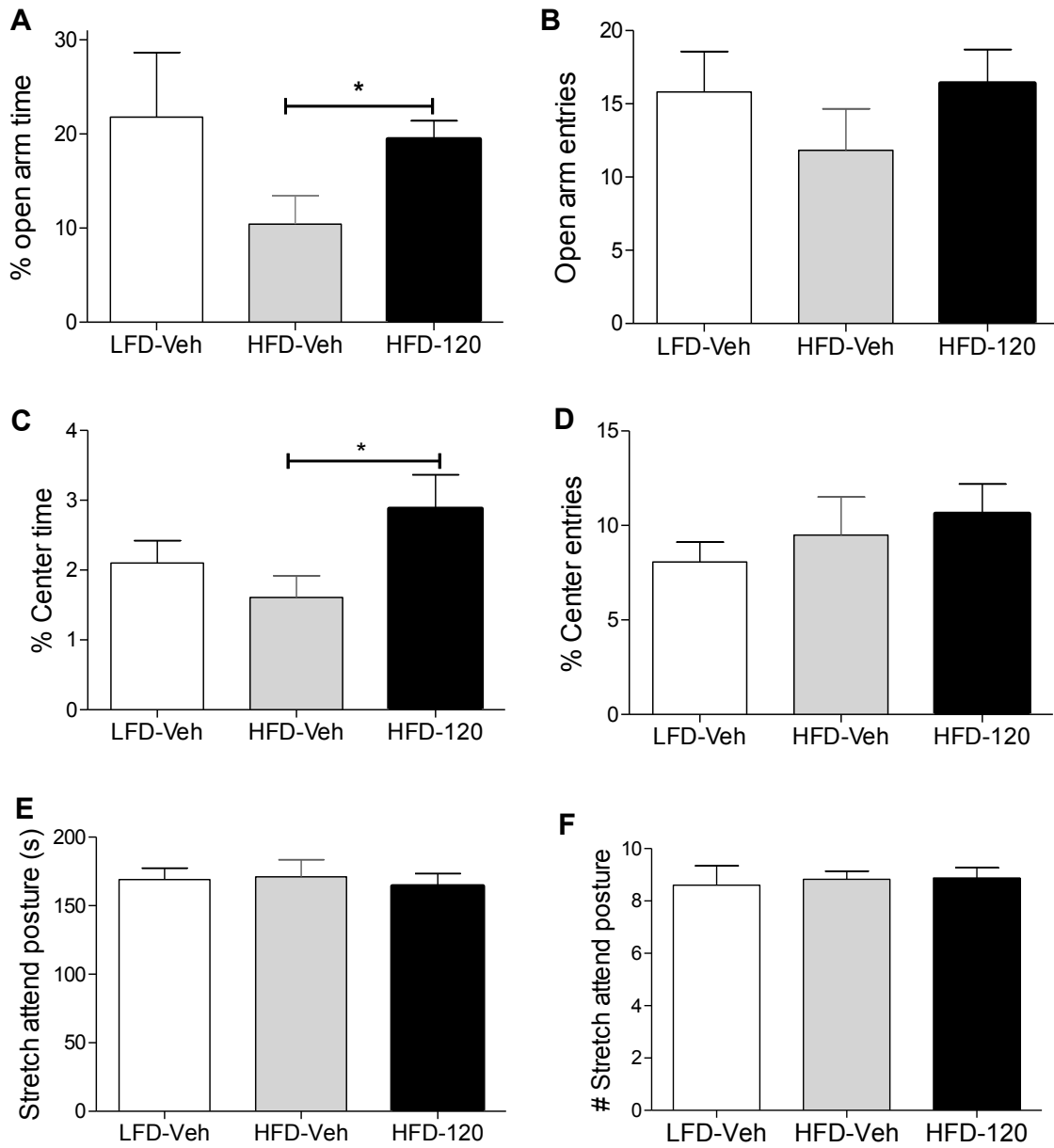
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



## References

- Bonnefond A, Lamri A, Leloire A, Vaillant E, Roussel R, Lévy-Marchal C, *et al* (2015). Contribution of the low-frequency, loss-of-function p.R270H mutation in FFAR4 (GPR120) to increased fasting plasma glucose levels. *Journal of medical genetics* **52**(9): 595-598.
- Chen H-F, Su H-M (2012). Fish oil supplementation of maternal rats on an n-3 fatty acid-deficient diet prevents depletion of maternal brain regional docosahexaenoic acid levels and has a postpartum anxiolytic effect. *The Journal of nutritional biochemistry* **23**(3): 299-305.
- Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, Souza CT, *et al* (2012). Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PloS one* **7**(1): e30571.
- Cornall LM, Mathai ML, Hryciw DH, McAinch AJ (2013a). GPR120 agonism as a countermeasure against metabolic diseases. *Drug discovery today*.
- Cornall LM, Mathai ML, Hryciw DH, McAinch AJ (2013b). The therapeutic potential of GPR43: a novel role in modulating metabolic health. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **70**(24): 4759-4770.
- Engelstoft MS, Park WM, Sakata I, Kristensen LV, Husted AS, Osborne-Lawrence S, *et al* (2013). Seven transmembrane G protein-coupled receptor repertoire of gastric ghrelin cells. *Molecular metabolism* **2**(4): 376-392.
- Fedorova I, Salem N, Jr. (2006). Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **75**(4-5): 271-289.
- Ferraz AC, Delattre AM, Almendra RG, Sonagli M, Borges C, Araujo P, *et al* (2011). Chronic  $\omega$ -3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. *Behavioural brain research* **219**(1): 116-122.
- Gariepy G, Nitka D, Schmitz N (2010). The association between obesity and anxiety disorders in the population: a systematic review and meta-analysis. *International journal of obesity (2005)* **34**(3): 407-419.
- Gong Z, Yoshimura M, Aizawa S, Kurotani R, Zigman JM, Sakai T, *et al* (2014). G protein-coupled receptor 120 signaling regulates ghrelin secretion in vivo and in vitro. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **306**(1): 28-35.
- Grewal SS, Shepherd JK, Bill DJ, Fletcher A, Dourish CT (1997). Behavioural and pharmacological characterisation of the canopy stretched attend posture test as a model of anxiety in mice and rats. *Psychopharmacology* **133**(1): 29-38.

- Hayley S, Poulter MO, Merali Z, Anisman H (2005). The pathogenesis of clinical depression: Stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity. *Neuroscience Neuroscience* **135**(3): 659-678.
- Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, *et al* (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature medicine* **11**(1): 90-94.
- Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, *et al* (2012). Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* **483**(7389): 350-354.
- Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, *et al* (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* **422**(6928): 173-176.
- Kiecolt-Glaser JK, Belury MA, Andridge R, Malarkey WB, Glaser R (2011). Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: a randomized controlled trial. *Brain, behavior, and immunity* **25**(8): 1725-1734.
- Languille S, Aujard F, Pifferi F (2012). Effect of dietary fish oil supplementation on the exploratory activity, emotional status and spatial memory of the aged mouse lemur, a non-human primate. *Behavioural brain research* **235**(2): 280-286.
- Lu X, Zhao X, Feng J, Liou AP, Anthony S, Pechhold S, *et al* (2012). Postprandial inhibition of gastric ghrelin secretion by long-chain fatty acid through GPR120 in isolated gastric ghrelin cells and mice. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* **303**(3): 367-376.
- McNamara RK, Hahn C-G, Jandacek R, Rider T, Tso P, Stanford KE, *et al* (2007). Selective Deficits in the Omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid in the Postmortem Orbitofrontal Cortex of Patients with Major Depressive Disorder. *BPS Biological Psychiatry* **62**(1): 17-24.
- Miller AH, Maletic V, Raison CL (2009). Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biological psychiatry* **65**(9): 732-741.
- Nakamoto K, Nishinaka T, Matsumoto K, Kasuya F, Mankura M, Koyama Y, *et al* (2012). Involvement of the long-chain fatty acid receptor GPR40 as a novel pain regulatory system. *Brain research* **1432**: 74-83.
- Negoro N, Sasaki S, Mikami S, Ito M, Tsujihata Y, Ito R, *et al* (2012). Optimization of (2,3-dihydro-1-benzofuran-3-yl)acetic acids: discovery of a non-free fatty acid-like, highly bioavailable G protein-coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1 agonist as a glucose-dependent insulinotropic agent. *Journal of medicinal chemistry* **55**(8): 3960-3974.

Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, *et al* (2010). GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell* **142**(5): 687-698.

Paulsen SJ, Larsen LK, Hansen G, Chelur S, Larsen PJ, Vrang N (2014). Expression of the fatty acid receptor GPR120 in the gut of diet-induced-obese rats and its role in GLP-1 secretion. *PloS one* **9**(2).

Phivilay A, Julien C, Tremblay C, Berthiaume L, Julien P, Giguère Y, *et al* (2009). High dietary consumption of trans fatty acids decreases brain docosahexaenoic acid but does not alter amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* **159**(1): 296-307.

Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1998). G protein-coupled receptor kinases. *Annual review of biochemistry* **67**(1): 653-692.

Rosenblat JD, Cha DS, Mansur RB, McIntyre RS (2014). Inflamed moods: a review of the interactions between inflammation and mood disorders. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **53**: 23-34.

Schwinkendorf DR, Tsatsos NG, Gosnell BA, Mashek DG (2011). Effects of central administration of distinct fatty acids on hypothalamic neuropeptide expression and energy metabolism. *International journal of obesity (2005)* **35**(3): 336-344.

Shaldubina A, Nemets B, Bersudsky Y (2002). Lack of effect of eicosapentaenoic acid in the Porsolt forced swimming test model of depression. *ACN Acta Neuropsychiatrica* **14**(5): 203-206.

Sharma S, Fulton S (2012a). Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *International journal of obesity (2005)* **48**.

Sharma S, Hryhorczuk C, Fulton S (2012b). Progressive-ratio Responding for Palatable High-fat and High-sugar Food in Mice. *JoVE Journal of Visualized Experiments*(63): 3754.

Shimpukade B, Hudson BD, Hovgaard CK, Milligan G, Ulven T (2012). Discovery of a potent and selective GPR120 agonist. *Journal of medicinal chemistry* **55**(9): 4511-4515.

Sontrop J, Avison WR, Evers SE, Speechley KN, Campbell MK (2008). Depressive symptoms during pregnancy in relation to fish consumption and intake of n-3 polyunsaturated fatty acids. *PPE Paediatric and Perinatal Epidemiology* **22**(4): 389-399.

Suckow AT, Polidori D, Yan W, Chon S, Ma JY, Leonard J, *et al* (2014). Alteration of the glucagon axis in GPR120 (FFAR4) knockout mice: a role for GPR120 in glucagon secretion. *The Journal of biological chemistry* **289**(22): 15751-15763.

Talukdar S, Olefsky JM, Osborn O (2011). Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases. *Trends in pharmacological sciences* **32**(9): 543-550.

Tanaka T, Katsuma S, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G (2008). Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **377**(4-6): 523-527.

Ulven T, Christiansen E (2015). Dietary Fatty Acids and Their Potential for Controlling Metabolic Diseases Through Activation of FFA4/GPR120. *Annual review of nutrition* **35**: 239-263.

Velloso La AEPdSCT (2008). Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation* **15**(3): 189-193.

Walenta E, Akiyama TE, Lagakos WS, Lackey D, Pessentheiner AR, Sasik R, *et al* (2014). A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nature medicine* **20**(8): 942-947.

Wellhauser L, Belsham D (2014). Activation of the omega-3 fatty acid receptor GPR120 mediates anti-inflammatory actions in immortalized hypothalamic neurons. BioMed Central Ltd.

Yonezawa T, Kurata R, Yoshida K, Murayama MA, Cui X, Hasegawa A (2013). Free fatty acids-sensing G protein-coupled receptors in drug targeting and therapeutics. *Current medicinal chemistry* **20**(31): 3855-3871.

## **Chapitre5 : Discussion générale**



Les civilisations des siècles antérieurs nous ont démontré qu'une bonne santé passe en premier lieu par une saine alimentation et une activité physique régulière afin de conserver notre balance énergétique équilibrée[449]. Mais, avec la diminution de l'apport en N-3 dans le régime alimentaire, la valeur absolue et relative des AG N-6 a considérablement augmentée ce qui a conduit à une augmentation du ratio N-6/N-3. Ce ratio est passé d'un rapport 1-2/1 à environ 16/1 en termes de LA, d'ARA versus d'ALA, d'AEP et d'ADH [236]. Toutefois, le rôle des AGPI N-3 dans l'alimentation sur la fonction cognitive a déjà été largement étudiée autant au cours de la période périnatale qu'au stade du vieillissement [450]. C'est pourquoi identifier les mécanismes neurocomportementaux par lesquels les facteurs alimentaires contribuent à l'augmentation de l'appétit et la prise de poids aura des implications importantes pour une meilleure compréhension sur le développement de l'obésité et des maladies métaboliques.

## **5.1. Rappel des objectifs**

Les objectifs des expériences effectuées au cours de ce travail de thèse étaient avant tout de déterminer dans quelle mesure l'apport déficitaire comparé à l'apport adéquat en AGPI N-3 pendant la période périnatale chez la souris:

- influence la prise alimentaire et plus particulièrement les effets de récompense et de motivation alimentaire chez la progéniture mâle, par suite des modifications des niveaux plasmatiques en AGPI N-3 dans le cerveau;
- modifie la composition corporelle, les dépenses énergétiques, les troubles métaboliques et neurologiques de type anxieux et dépressif chez la progéniture mâle.

Dans un deuxième temps, nous voulions évaluer l'effet d'une stimulation pharmacologique aigüe et chronique du GPR120 sur le SNC chez la souris sur :

- la prise alimentaire et en particulier sur la motivation alimentaire ainsi que les variations dans le bilan énergétique;
- le comportement émotionnel de type anxieux lorsque les souris sont exposées à une diète hypercalorique.

## 5.2. Rappel des principaux résultats

Cette thèse doctorale a généré plusieurs résultats et réflexions contribuant au développement des connaissances dans les domaines du déficit périnatal en N-3, sur la l'équilibre énergétique et plus précisément sur la motivation alimentaire, l'état d'anxiété et de dépression; de même que sur l'effet de la stimulation des récepteurs de ces acides gras au niveau du système nerveux central.

**Dans notre premier article**, nous nous sommes intéressées plus spécifiquement à la période périnatale. La majorité des études se sont penchées sur le rôle des AGPI N-3 et sur le fonctionnement du système nerveux central pendant la période prénatale [451]. À notre connaissance, nous sommes les premiers à évaluer le rôle des AGPI N-3 pendant la période périnatale sur la motivation alimentaire. Nos résultats ont montré que le déficit périnatal en AGPI N-3 réduit la concentration cérébrale en N-3. Ce déficit entraîne une tendance à augmenter la récompense alimentaire pour le sucrose mais n'altère pas l'apprentissage. De plus, dans un contexte d'environnement obésogène, le déficit périnatal en AGPI N-3 peut altérer l'humeur à type d'anxiété de que le poids

**Dans notre deuxième article**, sachant que la recherche de traitements pour les maladies a incité les chercheurs à pousser leurs études sur le rôle des AGPI, en particulier l'ADH, et leurs actions de signalisation au niveau des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG); nous nous sommes intéressées au GPR120. À rappeler que l'ADH est particulièrement abondant dans les phospholipides du système nerveux (cerveau, rétine) de tous les mammifères y compris l'homme [299] et peut avoir un effet anorexique lorsqu'il est injecté au niveau du système nerveux central [452]. Point important à noter également, ces RCPG spécifiques ont fait l'objet de nombreuses et récentes recherches pour leur potentiel thérapeutique [62] et en particulier le GPR120 qui est stimulé par ces AGPI N-3 [63]. Sachant que la perte de la fonction du GPR120 chez les souris freine les actions anti-inflammatoire et d'insulino sensibilité des AGPI N-3 [71] et qu'une variante dans le gène codant GPR120 chez humain augmente le risque d'obésité [70] et la glycémie à jeûn[453]; nous nous avons émis l'hypothèse que la stimulation pharmacologique des récepteurs spécifiques de ces AG tel que le GPR120 (plutôt que d'autres récepteurs cibles également couplés aux AGPI) entraînerait des modifications sur la balance énergétique.» À notre connaissance, nous sommes les premiers à évaluer l'effet d'une stimulation pharmacologique aigue et chronique au niveau central du GPR120 sur la balance énergétique et l'état émotionnel de type anxiété. Nos résultats ont montré que l'injection centrale aigüe de l'agoniste GPR120 réduit drastiquement la prise alimentaire sur une diète régulière durant les 4 premières heures post-injection et inhibe le comportement « approche-évitement » dans l'arène à champs ouvert. Par contre, l'injection centrale chronique de l'agoniste GPR120 réduit le comportement de type anxieux dans le labyrinthe en croix surélevé et l'arène à champs ouvert. Pourtant, cette injection

chronique n'affecte pas la prise alimentaire *ad libitum*, la dépense énergétique et le poids corporel sous une diète obésogène.

Nous allons dans les lignes qui suivent discuter des différents résultats de notre étude

### **5.3. Implications de la carence en oméga 3**

#### **5.3.1. Effets sur la reproduction et le poids des animaux**

Dans la littérature scientifique, l'impact négatif des diètes déficitaires en AG sur le déroulement normal de la gestation ou sur le nouveau-né a été évoqué pour l'homme ou l'animal [454]. En analysant nos données, nous avons remarqué que le nombre de progéniture (mâle uniquement) engendré par des mères déficientes en  $\omega$ -3 était nettement inférieur à celui des mères ayant une diète adéquate, soit un effectif respectivement de 24 vs 32 (annexe 1). De nombreuses et récentes études épidémiologiques ont démontré qu'une exposition prénatale avec une alimentation déficiente en AGPI, particulièrement les N-3, était associée à des effets négatifs sur le déroulement de la grossesse pouvant provoquer des avortements, un risque majoré d'accouchement prématuré, interférer sur différentes caractéristiques du nouveau-né, comme le poids, la taille et le périmètre crânien à la naissance [455]. Dans notre étude, nous ne saurions affirmer que l'exposition des femelles à une diète déficiente en N-3 au cours de la gestation jusqu'au sevrage soit induite d'effets sur les capacités de reproduction des animaux, puisque les cas de cannibalisme, de taille réduite des portées ont été observés au sein des 2 groupes. En effet, ni la durée de la gestation ni la taille des portées n'ont été influencées par l'exposition des mères à une diète déficiente. Cependant il faut mentionner que le nombre de fœtus n'a pas été déterminé au cours de la gestation lors de cette étude, ce qui aurait permis

d'évaluer le nombre d'avortements spontanés. Il est fort probable que les doses des autres AG incorporées à la diète déficitaire (en dehors de l'ADH) même lorsqu'inférieures, n'aient pu induire des effets délétères sur la durée de la gestation ou sur le nombre de souriceaux. Il a de plus été démontré que le plasma du cordon ombilical présente une plus grande concentration en acide arachidonique (AA) et en ADH que celui de la mère puisque ces derniers sont transférés au fœtus à travers le placenta [456]. Cela nous indique une mobilisation sélective et un apport préférentiel des AGPI à longue chaîne chez le fœtus [457].

### **5.3.2. Effets sur la prise alimentaire**

Il est aujourd'hui reconnu que la nature et la qualité de notre alimentation peuvent exercer des effets importants sur notre prise alimentaire. En effet, le contenu en lipides de notre cerveau correspond en bonne partie à notre apport alimentaire [458]. Wang et al. [459] ont évoqué une diminution de la prise alimentaire chez des souris placées d'abord sous une diète riche en AGS puis transférées à une diète riche en AGPI N-3. Cette réduction de la prise alimentaire a été corrélée à une inversion des niveaux élevés de l'ARNm codant pour les neuropeptides orexigènes, NPY et AgRP, dans le NAc de l'hypothalamus. Velloso et al. ont pour leur part rapporté que l'injection centrale des N-3 et des N-9 induit une forte réduction de la prise alimentaire spontanée. Cet effet qui a été entièrement restaurée après l'arrêt de l'administration [77]. De plus, un effet similaire a été rapporté avec l'acide oléique [460]. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que le déficit périnatal en AGPI N-3 altérerait la prise alimentaire de la progéniture. Toutefois, nos résultats révèlent que le déficit périnatal en N-3 n'altère pas la prise alimentaire *ad libitum* des souris qu'elles soient placées sous diète régulière ou sous diète hypercalorique (HFD) (Fig. 1 E). Ceci pourrait être occasionné tel

qu'exposé précédemment, par le fait que même lorsqu'on aurait administré une diète totalement déficitaire en AG à la mère durant la gestation, on y retrouverait une quantité d'AGPI N-3 dans le plasma du nouveau-né [456]. Ainsi, ce déficit alimentaire ne pourrait influencer la prise alimentaire. Lorsque nous avons calculé la prise alimentaire cumulative en termes d'apport calorique, en fonction de l'apport calorique nettement supérieur dans la diète hypercalorique (HFD), les souris sous HFD qu'elles soient du groupe N-3 adéquate ou N-3 déficitaire se sont mises à consommer davantage à partir de la 16<sup>ème</sup> semaine du début de leur diète et ce, comparativement aux souris sous diète régulière du groupe N-3 adéquat et N-3 déficitaire.

### **5.3.3. Effets sur la réponse hyperphagique après 3 jours de restriction alimentaire**

Puisqu'il n'y avait aucune modification de la prise alimentaire *ad libitum* dans les conditions normales, et compte tenu du lien entre la prédominance des AGPI N-3 dans les structures membranaires du système nerveux centrale et les comportements alimentaires, nous avons soulevé l'hypothèse que le déficit périnatal en AGPI N-3 aurait une incidence sur la réponse à la stimulation de l'appétit par une restriction alimentaire. Après 3 jours d'analyse sur la prise alimentaire régulière et du poids corporel, la portion d'aliments consommée a été réduite de moitié (environ 50 %) de la base habituelle. Ce régime de restriction alimentaire fut maintenu pendant 3 jours consécutifs avant le retour au libre accès à la nourriture. La prise alimentaire a été mesurée à intervalles de temps très précis soit 2h, 4h et 8h suivant la ré-administration de la nourriture de base (diète régulière). Nos résultats (annexe 6) montrent qu'en évaluant la prise alimentaire cumulative après 8h, le groupe N-3 déficitaire s'est nourri

significativement plus que le groupe N-3 adéquat. Ceci concorde avec les résultats de Mathai et al. [415] qui après une restriction alimentaire de 50 % pendant 5 jours chez des rats issus de mères ayant une diète déficitaire en AGPI N-3, avaient considérablement augmenté la prise alimentaire comparativement au groupe de rats issus de mères ayant une diète adéquate en AGPI N-3. Il est possible que la réponse hyperphagique observée chez les souris déficitaires soit occasionnée par des modifications au niveau de l'hypothalamus ventro-médian (VMH), représentant une structure du cerveau impliquée dans la contrôle de la balance énergétique. Il faut mentionner également que des études humaines ont démontrées que la sensation de la faim ou la stimulation de la prise alimentaire est inversement corrélée au taux de leptine circulant [461]. En raison des modifications dans les propriétés biophysiques de la membrane résultant du déficit alimentaire en AGPI N-3, le récepteur de la leptine peut devenir moins sensible à la leptine chez les souris du groupe N-3 déficitaire, pouvant ainsi entraîner une hyperphagie. Il est également possible que la réponse hyperphagique des souris du groupe N-3 déficitaire soit occasionnée par des modifications durables dans l'expression des gènes de neurones qui régulent l'appétit, pouvant être une conséquence des modifications dans le régime et en particulier pendant la période périnatale. Nous nous sommes penchés également sur le fait que les souris du groupe N-3 déficitaire ont développé une certaine insulino-résistance centrale en raison des troubles qu'aurait causés le déficit en N-3 pendant la période périnatale. À cet effet, une étude récente a démontré que les animaux sensibles à l'obésité sont hyperphagiques et ce, probablement parce qu'ils développent une résistance centrale à l'insuline qui possède une propriété anorexigène [462]. La réponse hyperphagique après 3 jours de restriction alimentaire est révélatrice des changements permanents dans la signalisation de l'appétit, puisque les souris du groupe N-3 déficitaire ne contrôlent pas leur

système de prise alimentaire en dépit de la restauration de l'alimentation avec une diète régulière contenant des AGPI N-3 après le sevrage. De plus, connaissant le rôle important que jouent les AGPI au niveau des corps cellulaires des neurones, étant eux-mêmes constitués de phospholipides contenant des acides gras hautement insaturés [463], il se peut que la fonction normale d'un neurone à signalisation de satiété puisse être stoppée. Ceci pourrait être le résultat d'une augmentation de l'apport alimentaire pour une stimulation spécifique de l'appétit (par exemple ; la restriction alimentaire). Nos résultats offrent un aperçu de l'étiologie des troubles de l'appétit tels que les crises de boulimie étant de plus en plus corrélées avec la pathologie de l'obésité.

#### **5.3.4 Effets sur la motivation alimentaire**

Ce phénomène de récompense alimentaire est bien compris dans les situations d'obésité, puisque pour la plupart des individus obèses, la surconsommation d'aliments palatables appétissants, riches en gras et en sucre, contribue fortement au développement de l'obésité et à des changements dans les circuits de récompense du cerveau qui participent au renforcement du besoin d'en consommer plus [7, 464]. En d'autres termes, l'obésité en soit peut être considéré comme un facteur incitant la tendance à fournir des efforts supplémentaires pour obtenir la nourriture, puisque nous avons vu que nos souris du groupe N-3 déficitaire avaient plus de masse grasse. Bien que les résultats de Berthoud [465] ont rapporté que des rats obèses placés sous diète riche en gras ont tendance à fournir un moindre effort pour obtenir la nourriture. La raison peut-être parce qu'ils ont trop de masse grasse limitant leur mobilité ou parce qu'ils sont trop rassasiés à cause du niveau élevé de la leptine circulante.



Il est également important de signaler que les altérations dans les niveaux de concentration de ces différents AG entraînent des altérations dans les propriétés membranaires, les activités physiques, les interactions cellulaires plus particulièrement au niveau des transporteurs et récepteurs [359, 466]. Toutes ces modifications ont une influence sur le fonctionnement du circuit de récompense dopaminergique qui influe sur le comportement alimentaire [36]. Des études récentes ont démontré qu'un régime maternel déficitaire en AG pendant la période de maturation cérébrale, réduit la plasticité neuronale à l'âge adulte [168] et altère l'expression des protéines dopaminergiques [467]. Les conséquences néfastes d'une diète déficitaire en AGPI N-3 sur la neurotransmission dopaminergique et sérotoninergique sont réversibles grâce à un régime équilibré en AGPI N-3 à la seule condition que ce régime soit appliqué avant l'âge du sevrage (21 jours postnatal, p21). Il s'avère ainsi important d'introduire rapidement dans la diète les AGPI N-3 et plus particulièrement pendant la période périnatale, afin de protéger le cerveau et ces processus de neurotransmission. Or, notre diète régulière, contenant des AGPI N-3 a été introduite le jour du sevrage. Nos résultats ont démontrés que les souris du groupe N-3 déficitaire, au cours de leur séance d'apprentissage ont recueillies une plus grande quantité de palettes de sucrose que les souris du groupe N-3 adéquat (Fig. 2 A) Cette observation suggère qu'elles sont beaucoup plus motivées que les souris adéquates à fournir un effort pour accéder à leurs récompenses. Il faut penser également que le seuil de signification n'est pas atteint probablement par manque de puissance statistique. Il est connu que l'attribution d'une valeur hédonique à une expérience ou un aliment implique la libération de dopamine au niveau du NAc, ce qui vient augmenter considérablement le désir d'obtenir une « récompense » [468]. Les souris du groupe N-3 déficitaire ont probablement une augmentation de l'influx dans leur système

neurodopaminergique. Il se pourrait également que ces modifications dans la neurotransmission affectent les récepteurs opioïdes localisés également au niveau du NAc. Lorsqu'on considère le seuil d'effort à fournir pour obtenir la récompense de sucre, les souris du groupe N-3 déficitaire ont une tendance ( $p=.08$ ) à émettre plus d'effort (Fig. 2 C) À cet effet, une étude a récemment révélé que la stimulation de ces récepteurs opioïdes stimulent la prise alimentaire, en particulier pour les aliments palatables [141] et que le déficit en N-3 pourrait entraîner une stimulation de ces récepteurs opioïdes. Le manque de valeur significative serait du probablement à la taille réduite des animaux dans les groupes.

Fait important à signaler la recension des écrits chez les souris placées sous une diète riche en matières grasses font référence à une réduction de la motivation pour le sucre. [469, 470]. Toutefois, il convient de noter que cette diminution de la motivation pour le sucre peut être le reflet du libre-accès à l'alimentation riche en gras une fois que la souris retourne dans sa cage. C'est la raison pour laquelle nous avons jugé bon de ne pas réaliser le test de motivation alimentaire au sein des groupes placés sous *HFD*.

### **5.3.5. Effets sur la mémoire et l'apprentissage**

L'hippocampe est une zone du cerveau essentielle à la mémoire et à l'apprentissage et permet de chiffrer le degré d'incertitude lié à l'obtention ou non d'une récompense [471]. Une étude a établi que les troubles cognitifs sont améliorés par l'apport d'une alimentation riche en AGPI N-3 [472], en démontrant une corrélation positive entre une réduction des niveaux d'AGPI N-3 au niveau de l'hippocampe et une altération des performances cognitives [450]. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un déficit périnatal en AGPI N-3 altérerait la mémoire et les troubles cognitifs. D'autres chercheurs ont affirmé que la réduction du contenu cérébral

en DPA, un AGPI de la famille des N-3 accompagnée d'une réduction d'ADH est associée à une déficience du comportement chez les rongeurs adultes préalablement nourris au régime déficitaire en AGPI N-3 [473, 474]. Bien que des données récentes indiquent qu'une carence alimentaire des AGPI peut provoquer une altération du comportement à la fois dans des modèles animaux et chez l'homme [403, 475], aucune modification des capacités d'apprentissage et de mémorisation n'a été mise en évidence dans l'une ou l'autre des deux expérimentations menées au cours de nos études. Les capacités de mémorisation ne semblent pas affectées à l'âge durant lequel a été réalisée l'expérimentation au sein de « *l'operant chamber* ». L'annexe 5A ne démontre aucune différence entre les deux groupes (adéquate/déficitaire) lorsque l'on compare le nombre de palettes de sucrose obtenu lors des séances d'entraînement sur ratio fixe FR1, FR1 (5sec), FR5. Dans l'annexe 5B en comparant le nombre de pressions sur le levier actif et celles sur le levier inactif, il fut observé pendant la durée de l'expérience que les 2 groupes ont pressé plus souvent le levier actif. Cela signifie que les souris ont fait l'association que le levier actif est celui qui délivrait la récompense alimentaire. Bien que des niveaux diminués d'ADH suite à une carence alimentaire puisse affecter diverses fonctions cognitive et motrice [344], il pourrait y avoir un processus compensatoire du cerveau durant le développement neuronal permettant de palier aux effets néfastes que pourraient occasionner le déficit en ADH pendant la période périnatale. Il aurait été intéressant d'évaluer le même type de comportement d'apprentissage plus tôt qu'attendre à l'âge adulte soit immédiatement après le sevrage. On aurait peut-être pu mettre en évidence la présence de troubles cognitifs en lien avec des processus neurodégénératifs de la mémoire et de l'apprentissage comme l'ont démontré d'autres études. Ceci soit par la réduction de la plasticité neuronale et l'activité comportementale, soit par l'abolition de la fonction neuronale

des endocannabinoïdes [168, 405]. Puisque le développement cérébral de la souris se fait essentiellement pendant la période post-natale, et la maturation des structures nerveuses pendant les trois premières semaines de vie [345, 346], il s'avère probable que le déficit périnatal en AGPI N-3 n'ait pu causer de dommages neuronaux pouvant altérer la mémoire et l'apprentissage de la progéniture. De plus, durant les dernières étapes de gestation et très tôt dans la vie post-natale, l'ADH et l'AA s'accumulent rapidement dans le cerveau à travers le placenta et l'allaitement maternel ou artificiel [347, 348]. Pendant cette période, la diète régulière contenant les N-3 fut remplacée par une diète déficitaire lors du sevrage. À notre connaissance, nos données sont les premières à évaluer l'impact d'une alimentation totalement déficitaire en AGPI N-3 de la période périnatale au sevrage sur la motivation alimentaire à l'âge adulte.

### **5.3.6. Constituants gras des diètes adéquate et déficitaire en oméga-3**

Les divers éléments composant les diètes (adéquate et déficitaire en N-3) utilisées dans notre étude ont été minutieusement choisis et en particulier les constituants gras. L'huile de lin obtenu par les graines de lin moulues, contient l'ALA, qui par l'allongement et la désaturation de sa chaîne carbonée est converti en ADH et APE dans le corps [476]. Selon le conseil canadien du lin « *Flax Council of Canada* » [477] l'ALA constitue 57 % des acides gras totaux contenu dans le lin, le désignant comme étant la source la plus riche de l'ALA dans l'alimentation en Amérique du Nord. Notre diète adéquate en contient 4.81g / Kg alors que notre diète déficitaire en est complètement dépourvue, éliminant ainsi toute source probable d'ADH et d'APE. La qualité de l'huile de carthame « *safflower oil* » est quant à elle élevée en raison de sa composition en AG. Elle est composée d'environ 6-8 % d'acide palmitique, 2-3 %

d'acide stéarique, 16-20 % d'acide oléique et 71-75 % d'acide linoléique [478]. Une étude comparant différents types d'huile de carthame pure a démontré que la quantité d'acide linoléique (ALA, C18 :3) contenue dans cette huile se retrouve soit sous forme de trace ou d'indélectable [479]. La différence entre la diète adéquate et déficitaire en huile de carthame est minime, soit 1.3 g, avec respectivement 17.7 g et 19 g pour chaque diète et aucune source possible de précurseurs d'acides gras  $\omega$ -3 (ADH et AEP). Pour sa part, l'huile de coco ne contient pas d'acide linoléique mais contient environ 49 % d'acide laurique [480]. En raison de sa haute teneur en gras saturés, il est résistant au rancissement et à l'oxydation. Les diètes adéquate et déficitaire contiennent respectivement 75 g et 81 g.

### **5. 3.7. Effets sur la composition corporelle, les dépenses énergétiques**

Compte tenu qu'il n'y avait pas de différence dans le poids des souris du groupe N-3 adéquate et celles du groupe N-3 déficitaire (Fig. 1 B,  $p \leq 0,05$ ), nous avons voulu déterminer leur composition corporelle. Nos résultats ont démontré qu'au sevrage les souris du groupe N-3 déficitaire ont une différence significative de gain de poids par rapport aux souris du groupe N-3 adéquat (annexe 1). Apparemment, les AGPI N-3 induisent non seulement l'oxydation des acides gras mais réduisent aussi par induction de l'expression des gènes impliqués dans la thermogénèse, les dépôts de gras corporel chez les êtres humains et les animaux, en augmentant de ce fait la production totale de la chaleur du corps [481, 482]. Lors de la détermination de la composition corporelle, les souris du groupe N-3 adéquate sous diète régulière ont moins de masse grasse. Cela pourrait être relié également à l'augmentation de l'oxydation des lipides chez ces souris en raison de l'activation des peroxysomes proliferator-activated récepteur (PPAR), induite par les oméga-3 [483, 484].

C'est ainsi sans surprise que les souris du groupe N-3 déficitaire sous diète hypercalorique ont plus de masse grasse (Fig.1C). En examinant la masse maigre, une différence significative a été signalée chez les souris du groupe N-3 déficitaire placées sous diètes régulières en comparaison à celles du groupe N-3 adéquate (Fig.1D). Étant donné que l'APE et l'ADH ont un effet anti-adipeux lors du développement de l'obésité il est possible que la présence de ces AG dans la diète adéquate ait réduit l'accumulation des graisses en limitant l'hypertrophie et l'hyperplasie des cellules adipeuses [485]. De plus, il est connu que ces AGPI réduisent la masse de tissu adipeux essentiellement au niveau de l'abdomen [486]. Les résultats d'une étude publiée confirment l'influence de l'ADH et de l'AEP sur la mitogénèse et la bêta-oxydation des AG dans les tissus adipeux [487]. Nos données réaffirment les résultats d'autres études montrant chez des souris ou des porcs qu'une diète riche en acide linoléique conjugué à un ligand de PPAR $\alpha$  (cis, les isomères trans de 18: 2 n-6) permettant de réduire la graisse corporelle et augmentant la masse maigre [488, 489]. Ainsi, la réduction de poids corporel par l'huile de poisson accompagnée d'une réduction des réserves de gras a été confirmée [490]. Ceci pourrait expliquer pourquoi les souris sous diète N-3 adéquate ont une réduction significative de leur masse grasse que ce soit sous diète régulière ou diète hypercalorique (Fig. 1 C).

La fonction principale du tissu adipeux brun est de brûler les graisses afin de produire de la chaleur et il a été récemment mis en évidence que ce tissu adipeux est présent sous forme active chez l'homme adulte [491]. Dans le cadre de la régulation de la balance énergétique, cette observation revêt toute son importance puisque les rongeurs sont capables de brûler le surplus énergétique consommé au cours d'une diète hypercalorique [492]. C'est pourquoi le tissu adipeux brun pourrait avoir un rôle décisif dans l'homéostasie énergétique et la

régulation de la masse corporelle en plus de l'effet antiadipogénique de l'ADH [493]. Nos souris du groupe N-3 adéquate avaient probablement beaucoup plus de graisse brune dans leur gras corporel. On pourrait également penser qu'il y a eu un effet sur la programmation métabolique ou encore que le facteur nutritionnel de déficit en AGPI N-3 durant la période périnatale pouvait causer des modifications physiologiques et métaboliques durables. Des études animales portant sur les diètes obésogènes ont rapporté des modifications constantes dans la morphologie et le métabolisme des adipocytes concernant l'augmentation de la taille et du nombre des adipocytes [494, 495]. Les souris du groupe N-3 déficitaire sous diète hypercalorique âgées de 20 semaines ont probablement une hyperplasie et une hypertrophie des adipocytes dans leur masse grasse. Ces effets sur la thermogénèse alimentaire suggèrent que les AGPI N-3 peuvent jouer un rôle essentiel dans l'homéostasie énergétique.

While HFD increased caloric intake as expected, there was no difference between N-3 Def and

### **5.3.8. Effets sur le métabolisme glucidique et la tolérance à l'insuline**

La carence en AGPI de la famille des N-3 en général contribue à la résistance à l'insuline et au syndrome métabolique [496, 497]. Des données confirment plus précisément [498] qu'une consommation insuffisante en AGPI N-3 pendant la période périnatale augmente le risque de développer le diabète et bien d'autres maladies [499]. Par définition, la résistance à l'insuline est un état métabolique dans lequel l'insuline à des concentrations physiologiques ne parvenant pas à produire une réponse biologique normale afin de maintenir une euglycémie. Puisque le lien entre le diabète et le déficit périnatal en AGPI N-3 est déjà bien établi et que les souris du groupe N-3 déficitaire présentaient une masse grasse significativement supérieure à celles du groupe N-3 adéquate nous avons émis l'hypothèse que

nos souris du groupe N-3 déficitaire ayant une diète régulière développeraient une résistance à l'insuline et/ou une intolérance au glucose. Lors du test d'insulino-résistance provoquée par voie intra-péritonéale et suite à l'injection d'insuline (Humulin-R 100 U / ml, 0.9 U/kg ou 0.1 ml/10g), nos résultats (Annexe 7A) de glycémie brute démontrent que les souris du groupe N-3 déficitaire (N-3 Def) ont dès le départ une hyperglycémie supérieure aux souris du groupe  $\omega$ -3 adéquat (N-3 Ad) et qui persiste pendant toute la durée de l'expérience malgré l'injection d'insuline. Cette hyperglycémie persistante et significativement différente chez les souris du groupe N-3 Def, pourrait nous amener à conclure à une résistance à l'insuline. Mais lorsqu'on normalise cette glycémie par rapport à la glycémie basale (Annexe 7B), on voit que les 2 courbes se superposent. Cela signifie que l'on parvient à la même réponse d'insulino-sensibilité entre les 2 groupes (N-3 adéquat et N-3 déficitaire). On peut donc conclure qu'il y a une hyperglycémie chez les souris du groupe N-3 Def occasionnée probablement par un léger dérèglement au niveau des cellules  $\beta$  du pancréas, mais qu'il n'y a pas d'insulino-résistance puisqu'on observe le même niveau de sensibilité à l'insuline. À l'aide du clamp euglycémique hyperinsulinémique, nous aurions pu mettre en évidence la résistance hépatique à l'insuline chez les souris du groupe N-3 Def en raison de la production hépatique de glucose plus élevée lors de la stimulation de l'insuline par rapport aux souris témoins du groupe N-3 Ad.

L'intolérance au glucose par définition survient lorsque l'organisme réagit moins bien aux effets de l'insuline devant faire plus d'effort afin de contrôler les taux de glucose sanguin dans les valeurs de la normale. Lors du test d'hyperglycémie provoquée par voie orale, nos résultats (Annexe 7C) de glycémie brute démontrent que les souris du groupe N-3 Def ont dès le départ une légère hyperglycémie comparativement aux souris du groupe N-3 Adeq. Lorsque l'on normalise cette glycémie par rapport à la glycémie basale (Annexe 7D), il n'y a



aucune différence entre les 2 groupes (N-3 adéquat et N-3 déficitaire). On peut donc conclure qu'il y a une tendance à l'hyperglycémie au départ chez les souris du groupe N-3 Def et qu'il n'y a pas d'intolérance au glucose.

En résumé, il existe un problème avec la régulation de l'homéostasie glucidique puisque lors des tests les souris du groupe N-3 déficitaire ont une hyperglycémie basale dès le départ dans l'OGTT et l'IP-ITT mais il n'y a aucun changement à l'égard de la sensibilité à l'insuline ni de défaut de tolérance au glucose.

### **5.3.9. Comportement de type anxieux et dépressif**

L'effet hédonique d'un aliment palatable peut promouvoir la suralimentation et le gain de poids [500]. Il est bien connu que les facteurs alimentaires peuvent causer d'importantes modifications sur la fonction et la plasticité du cerveau entraînant des troubles mentaux [501]. Des auteurs ont démontré que les animaux recevant un régime totalement carencé en AGPI pendant 1 mois à partir du jour de la naissance présentaient une réduction du taux d'ADH dans les membranes du cortex frontal et une plus grande anxiété dans le test du labyrinthe surélevé [502, 503]. Nous avons émis l'hypothèse que l'apport inadéquat d'AGPI N-3 pendant la période périnatale puisse causer un comportement de type anxieux. Nos résultats démontrent que malgré la réduction significative d'AEP dans le cerveau des souris du groupe N-3 déficitaire (progéniture femelle issue des mêmes cohortes) au sevrage, les souris de sexe mâle ne montrent aucun signe d'anxiété lorsqu'elles sont soumises à une diète régulière. Ainsi, dans l'appareil *Elevated Plus Maze* (EPM) ou labyrinthe en croix surélevé, il n'existe aucune différence entre les souris du groupe N-3 adéquat et celles du groupe N-3 déficitaire que ce

soit dans le % de temps passé dans les bras ouverts ou encore dans le nombre d'entrées effectué dans les bras ouverts ( Fig. 3 C, D) lorsqu'elles sont soumises à une diète régulière.

Par la suite, nos résultats ont également démontré, lors du deuxième test d'anxiété « *l'open field* » qu'il n'y a eu aucun comportement de type anxieux entre les souris du groupe N-3 adéquat et celles du groupe N-3 déficitaire. Le nombre d'entrées au centre et la durée passée au centre de l'appareil ne montraient aucune différence entre les 2 groupes de souris lorsqu'elles étaient soumises à une diète régulière et ce, bien que des études aient pu montrer le lien entre le déficit en AEP et l'anxiété [408] À cet effet, une étude menée chez des toxicomanes démontre que lorsqu'ils reçoivent l'EPA (plus de 2 g/jour), il y a une réduction significative de l'anxiété comparativement à ceux recevant un placebo [50]. D'autres études chez des personnes normales, sans dépression clinique ou souffrant de troubles anxieux, révèlent qu'une augmentation de l'apport de l'EPA améliore leur capacité à gérer le stress et à générer des améliorations dans l'humeur [280, 504].

La diète obésogène ne potentialise pas pour autant le comportement de type anxieux. Bien qu'il soit connu que les AGS peuvent induire une inflammation et une dégénérescence neuronale dans le cerveau provoquant l'anxiété. On s'attendait à ce que la diète obésogène augmente le niveau d'anxiété des souris, surtout celles du groupe N-3 déficitaire. Tel ne fut pas le cas. On peut spéculer qu'il y a un effet plateau C'est-à-dire que la diète déficitaire a déjà causé un état d'anxiété au maximum (niveau d'anxiété à atteint le plafond) et que la diète obésogène ne peut plus augmenter ce niveau. Cet effet plateau peut être dû à la neuroinflammation. Cette neuroinflammation qui peut-être occasionnée par la forte concentration des dérivés de l'AA et des éicosanoïdes qui ont des effets pro-inflammatoires

dans le cerveau des souris du groupe N-3 déficitaire [505, 506]. De plus, la diète obésogène elle-même est un inducteur pro-inflammatoire [507] pouvant accroître cette neuroinflammation et causer l'état plafond du niveau d'anxiété chez les deux groupes (N-3 Ad et N-3 Def).

De nombreuses études ont établi le lien entre la dépression et la réduction des niveaux AGPI N-3 [508, 509]. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'apport inadéquat d'AGPI N-3 pendant la période périnatale peut causer un comportement de type dépressif. Nos résultats montrent que les souris du groupe N-3 déficitaire ont un temps d'immobilité significativement supérieure comparativement aux souris du groupe N-3 adéquat. Ceci suggère qu'elles sont plus déprimées. Notre étude soutient les résultats d'autres recherches mettant en évidence une association entre la dépression et l'augmentation du rapport de AA/DHA [509, 510]. Ainsi nos souris du groupe N-3 déficitaire possèdent un comportement de type dépressif même sous diète régulière et présentent un ratio DHA/AA et de N-3/N-6 beaucoup plus faible que celles du groupe N-3 adéquat. Puisque l'anxiété a une co-morbidité significative avec la dépression, il est donc possible que la prise d'AEP puisse réduire la dépression. Des études indiquent que la supplémentation en AEP améliore les symptômes dépressifs chez les patients résistants aux traitements de dépression majeure unipolaire [511, 512] et de dépression bipolaire [513]. Les preuves suggèrent une corrélation positive entre la sévérité de la dépression et des troubles cognitifs [514]. La dépression majeure est associée à de plus grandes déficiences cognitives alors que la dépression mineure a peu ou aucun effet sur les performances cognitives [515]. Parfois, les niveaux inférieurs en AGPI N-3 entraînent des niveaux significativement plus faibles d'ADH [509, 516] accompagné de dépression majeure et de grandes déficiences cognitives alors que des niveaux inférieurs d'AEP seul ou une association avec l'ADH causent

une dépression majeure [517]. Des études animales prouvent que la carence en N-3 pendant d'une génération entière affecte profondément les comportements émotionnels à titre de dépression et d'agression [518] ce qui soutient les associations cliniques et épidémiologiques entre le déséquilibre du ratio N-6/N-3 et les troubles de l'humeur [519]. Toutefois, malgré le taux significativement bas d'EPA dans le cerveau et la présence d'un comportement de type dépressif chez les souris du groupe N-3 déficitaire, aucun trouble cognitif ou de l'apprentissage n'a été observé au sein de ce groupe N-3 déficitaire. On peut ainsi dire qu'il s'agissait d'une dépression mineure.

Il est important ici de signaler les conséquences de l'effet du déficit alimentaire en AGPI durant la gestation sur les générations futures. Peu d'études à ce sujet sont disponibles mais Lim et al. [520] ont récemment démontré que les rats adultes ayant une perte de 70 % du contenu cérébral en ADH ont plus de difficultés à effectuer des tâches spatiales. D'autres études générationnelles ont observées des effets fonctionnels sur la perte de sensibilité de la rétine après trois générations en carence de N-3 [521]. D'autres études ont aussi signalé qu'avec une perte d'environ 40-50 % d'ADH au niveau du cerveau les rats n'avaient aucune altération des performances spatiales [522, 523]. Une autre étude a réussi à produire chez des rats une réduction d'ADH au niveau du système nerveux d'environ 50 % à l'intérieur d'une première génération [524]. Ainsi, les manifestations sur la physiologie de la rétine et sur le comportement cérébral apparaissent généralement lors d'une diminution de 50 % ou plus en ADH dans le cerveau ou la rétine. Dans notre étude, il se pourrait que notre modèle de déficience pendant la « première génération » ne soit pas assez puissant pour générer une réduction d'ADH importante au niveau du système nerveux central, pouvant causer des modifications fonctionnelles de type anxieux mais plutôt dépressif.

## **5.4. Implications de la stimulation aiguë et chronique du GPR120**

Dans notre deuxième étude, nous savons que la recherche de traitements pour les maladies a incité les chercheurs à pousser leurs études sur le rôle des AGPI, en particulier l'ADH, et leurs actions de signalisation au niveau des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). À rappeler que l'ADH est particulièrement abondant dans les phospholipides du système nerveux (cerveau, rétine) de tous les mammifères y compris l'homme [299] et peut avoir un effet anorexique lorsqu'il est injecté au niveau du système nerveux central [452]. Ces RCPG spécifiques ont fait l'objet de nombreuses et récentes recherches pour leur potentiel thérapeutique [62] et en particulier le GPR120 qui est stimulé par les AGPI N-3 [63]. Sachant que la perte de la fonction du GPR120 chez les souris freine les actions anti-inflammatoire et d'insulino sensibilité des AGPI N-3 [71] et qu'une variante dans le gène codant GPR120 chez humain augmente le risque d'obésité [70] et la glycémie à jeûn [453]; nous avons émis l'hypothèse que la stimulation pharmacologique des récepteurs spécifiques de ces AG tel que le GPR120 entraînerait des modifications sur la balance énergétique et l'état émotionnel.

### **5.4.1. Effets sur la prise alimentaire et la motivation alimentaire**

Les récepteurs couplés à la protéine G jouent un rôle essentiel dans les mécanismes contrôlant la prise alimentaire [525]. Parmi ces récepteurs liés aux AG, le GPR40 et GPR120 ont été identifiés pour se lier aux récepteurs des AGPI-LC, les N-3 [63, 64] tels que l'ADH, l'AEP et l'ARA. Plus précisément, le récepteur GPR120 a été impliqué dans plusieurs mécanismes tels que la régulation de la sécrétion intestinale d'incrétine comme le glucagon-like peptide 1 (GLP-1), la régulation de l'adipogénèse, la lipogénèse, l'inflammation, l'intolérance au glucose, la sensibilité à l'insuline et la préférence pour la nourriture [63, 69,

71, 72]. De plus, faisant suite à notre première étude sur les AGPI N-3, il a été démontré que la réduction des phospholipides membranaires en ADH inhibe le couplage-dépendant de la protéine G dans le signal de transduction au niveau de la rétine [526]. Des modifications dans les caractéristiques biophysiques des membranes neuronales entravent les connexions de configuration fonctionnelle post-couplage en les rendant moins favorables énergétiquement. Connaissant ces données, nous avons émis l'hypothèse qu'une stimulation du GPR120 au niveau du système nerveux central aurait des conséquences sur la prise alimentaire et la motivation alimentaire. Nos résultats montrent que la stimulation centrale aiguë du GPR120, à différentes concentrations (minimale : 0,1  $\mu$ M; maximale : 1  $\mu$ M dans une solution de 1  $\mu$ L) provoque une réduction importante de la prise alimentaire *ad libitum*, sous diète régulière, de 1, 2 et 4 heures post-injection. Cette réduction est respectivement de 80 % et 72 % de l'apport alimentaire à la première et à la deuxième heure post-injection.

Sachant que l'EC<sub>50</sub> de GPR120 III est de 17 nM (nano molaire), nos concentrations utilisées, maximale (1  $\mu$ M) et minimale (0,1  $\mu$ M) sont supérieures à l'EC<sub>50</sub> (17 nM) *in vitro* de l'agoniste. Notons que la concentration efficace médiane (EC<sub>50</sub>) est une mesure de concentration de médicament, d'un anticorps ou d'une toxine qui induit une réponse à mi-chemin (médiane) entre la ligne de base et l'effet maximal après un certain temps d'exposition à celui-ci. Elle est couramment utilisée en tant que mesure de l'efficacité d'un médicament et représente la concentration d'un composé où 50 % de l'effet maximal est observé dans une courbe dose-effet. Rappelons que les doses choisies pour l'agoniste GPR120 (GPR120 III), ont été basées sur les résultats d'un article utilisant ce même agoniste au niveau du cerveau en le qualifiant du plus puissant et sélectif agoniste GPR120 commercialisé et disponible [423].

Signalons toutefois, que la valeur de l'EC50 indiquée (17nM) est la concentration de l'agoniste où 50 % de l'effet maximal est observé au niveau des cellules (signalisation au niveau  $\beta$ -arrestin). On ne sait pas à quoi correspond l'EC50 au niveau du tissu cérébral. Dans ce cas-ci, les effets observés au niveau cellulaire (étude *in vitro*) à ceux observés dans notre étude chez les souris (étude *in vivo*) doivent être prises avec considération.

Puisque l'agoniste spécifique du GPR120 que nous avons utilisé possède une certaine affinité pour les récepteurs GPR40, nous avons procédé à une expérience de contrôle avec un agoniste spécifique du GPR40 (TAK-875). L'agoniste de GPR40 à concentration maximale de 1  $\mu$ L dans une solution à 1  $\mu$ M, n'a pas affecté la prise alimentaire à aucun moment de la durée de l'expérience. Ceci démontre que l'effet anorexique observé est bien occasionné par la stimulation spécifique des récepteurs GPR120. L'effet anorexique de la stimulation centrale aiguë du GPR120 concorde avec les études qui montrent que les AGPI, y compris l'ADH et l'AEP, mais non les gras saturés, diminuent la prise alimentaire lorsqu'ils sont administrés centralement [452, 527]. Ainsi, le GPR120 est exprimé au niveau des neurones NPY de l'ARC [77] qui, lorsqu'elles sont stimulées ont un effet anorexigène.

Toutefois, la stimulation centrale chronique du récepteur GPR120, à l'aide d'une pompe osmotique qui délivre soit un véhicule (DMSO 1 % dilué dans du salin) ou un agoniste de GPR120 (1  $\mu$ M / jour dans 1  $\mu$ L ;  $\sim$  42 nM / heure) à une vitesse d'écoulement de 0.25  $\mu$ L / h dans le ventricule latéral pendant 21 jours, ne réduit pas la prise alimentaire *ad libitum*, dans un contexte d'environnement obésogène avec le HFD. Ce manque d'inhibition de la prise alimentaire, suite à la stimulation centrale chronique du GPR120 sous HFD peut être provoqué par l'activation transitoire du récepteur ou la désensibilisation. La désensibilisation se définit

comme une réduction progressive de transduction du signal qui se produit plus ou moins rapidement après l'activation d'un récepteur selon l'agoniste et la voie de signalisation [528]. Cette même publication a rapporté que la désensibilisation du récepteur couplé à la protéine G peut se produire lors les minutes suivant l'exposition à l'agoniste et ainsi réduire leur signalisation à la stimulation maximale jusqu'à 70-80 %.

La consommation d'aliments palatables et gratifiants, à forte densité énergétique, est un facteur majeur favorisant le surpoids et l'obésité. Le NAc est une région importante du cerveau qui contrôle la motivation alimentaire et le comportement dirigé vers un aliment [529]. Puisque la stimulation centrale aigüe du GPR120 a réduit la prise alimentaire, nous avons donc émis l'hypothèse que cette même stimulation centrale aigüe aurait une influence sur la motivation alimentaire. L'analyse de nos données nous a permis de constater que la stimulation aigüe centrale par l'agoniste GPR120 diminue les effets de motivation alimentaire puisque le nombre de récompenses acquises lors du test de conditionnement dans « *l'Operant Chamber* » a considérablement diminué en comparaison aux souris qui ont reçues le véhicule. Il se pourrait que la stimulation des récepteurs GPR120 par cet agoniste inhibent les récepteurs opioïdes au niveau du NAc puisque la stimulation de ces derniers est connu pour avoir un effet sur celle de la motivation des aliments palatables [141]. Cette injection a également réduit considérablement le seuil du point d'arrêt. Ce seuil détermine le niveau auquel la souris est motivée à fournir l'effort afin d'obtenir sa récompense comparativement aux souris du groupe « contrôle » ayant reçu l'injection du véhicule. Il est à noter que notre injection centrale aigüe de l'agoniste (1 $\mu$ M) a été réalisée 1 heure avant le test, période durant laquelle nous avons eu approximativement l'effet significatif sur la réduction de la prise alimentaire. Il est intéressant ici de noter que cette injection aigüe centrale de l'agoniste n'a pas affecté l'apprentissage des



souris, puisque la proportion de pressions de levier actif et inactif est demeuré semblable entre les groupes.

#### **5.4.2. Effets sur le bilan énergétique**

Les conséquences d'une alimentation hypercalorique, le plus souvent hyperlipidique, sont bien connues chez les rongeurs et les primates en se traduisant à la fois par une hyperplasie et une hypertrophie des adipocytes [530]. Le rôle de GPR120 en tant que récepteur des AG régule le métabolisme lipidique dans l'ensemble du corps en intervenant particulièrement dans la distribution graisseuse [69]. De plus, l'administration d'un agoniste oral GPR120 a récemment été signalé pour avoir de plus grandes actions métaboliques dans le cadre d'un régime alimentaire riche en graisses [531]. Nous avons ainsi voulu évalué les effets d'une stimulation prolongée (chronique) centrale de l'agoniste sur les paramètres de la balance énergétique chez les souris ayant une diète obésogène. Puisque la stimulation chronique centrale du GPR120 n'a eu aucun effet sur la prise alimentaire *ad libitum* sur le HFD, nous avons également voulu évaluer d'autres paramètres de la balance énergétique à savoir le quotient respiratoire et l'activité locomotrice chez des souris avec des mini-pompes osmotiques livrant soit l'agoniste de GPR120 ou le véhicule pendant 21 jours.

Tel que déjà mentionné, la prise alimentaire *ad libitum* sur le HFD était similaire entre les souris avec mini-pompe contenant le GPR120 et les souris avec mini-pompe contenant le véhicule, lors de la stimulation chronique centrale. Toutefois, lorsque l'on compare la consommation totale en termes de calories, nous ne sommes pas surpris de constater que l'exposition à la diète HFD augmente l'apport calorique par rapport aux souris alimentées avec la diète régulière (LFD). En comparant la différence dans la prise de poids entre les souris

sous HFD (veh vs GPR120), le gain de poids était similaire entre les groupes. En plus de la prise alimentaire, le ratio d'échange respiratoire (RER) s'avère être également sensible aux changements dans le métabolisme de l'énergie qui survient lors d'une alimentation hypercalorique à court terme [532]. Le RER est nettement inférieur chez les souris sous diète HFD comparativement au groupe sous diète régulière, ce qui est conforme aux règles métaboliques et témoigne d'une plus grande utilisation des lipides par rapport aux hydrates de carbone. Par contre ce ratio était comparable entre les souris avec mini-pompe GPR120 sous HFD et souris mini-pompe véhicule HFD. Ceci signifie que l'agoniste GPR120 n'affecte pas le RER sous diète obésogène. Le compte d'activité dans sa totalité (durée de 24h) était similaire entre les groupes (LFD vs HFD). Nous avons observé une légère augmentation de l'activité dans le groupe contrôle (souris avec mini-pompe véhicule sous diète hypocalorique) durant les premières heures du cycle noir, probablement parce que ces souris pèsent moins donc elles bougent plus. Une étude récente a démontré que des souris mutantes déficientes en GPR120, âgées entre 15 et 16 semaines et soumises à un HFD, n'ont aucune différence en terme de dépenses énergétiques comparativement aux souris sauvages durant leur phase inactive (lorsque la salle est éclairée). Cependant, celles âgées entre 9 et 10 semaines, déficientes en GPR120 et placées sur HFD ont une réduction de leurs dépenses énergétiques en comparaison aux souris sauvages [70]. On pourrait croire que dépendamment de l'âge ou du temps d'exposition à une diète hypercalorique, l'agoniste du GPR120 réagit différemment.

### **5.4.3. Le comportement émotionnel de type anxieux une fois que les souris seraient exposées à une diète obésogène**

En plus d'affecter toutes les tranches d'âge, le nombre alarmant de jeunes adultes souffrant de troubles anxieux ne fait qu'augmenter [533], pressant impérativement le développement de stratégies thérapeutiques visant à modérer l'incidence des troubles de l'humeur. Compte tenu de l'action anxiolytique associée à l'alimentation riche en AGPI N-3 [280, 534] et de l'activation du GPR120 par les N-3 [71], nous avons voulu à déterminer si la stimulation centrale des récepteurs GPR120 module le comportement de type anxieux en utilisant les deux tests standards de l'anxiété: *Elevated Plus Maze* (EPM) et *Open Field Test* (OFT). Nos résultats démontrent que sous diète régulière, l'injection centrale aigüe de l'agoniste, tend à réduire le comportement de type anxieux puisque les souris injectées ont tendance à passer plus de temps dans les bras ouverts en comparaison au groupe contrôle. Ceci signifie que les souris ne sont pas effrayées par les espaces ouverts et qu'elles ont tendance à être moins anxieuses. Cependant dans l'OFT lorsque nous comparons les souris qui ont reçu le véhicule à celles ayant reçu l'agoniste, ces dernières ont un temps et une fréquence d'allongement du tronc significativement réduites. Cette posture correspond au comportement lié aux conflits ; correspondant à une attitude approche-évitement [535].

Lors de la stimulation centrale chronique, les souris sous HFD avec la pompe osmotique contenant l'agoniste du GPR120 ont significativement passé plus de temps dans les bras ouverts de l'EPM sans toutefois modifier leurs nombres d'entrées dans les bras ouverts comparativement aux souris sous HFD avec pompe osmotique contenant le véhicule. Pourtant le temps alloué dans le centre de l'OFT a été significativement augmentée chez les souris

traitées par l'agoniste sous HFD sans aucune modification du nombre d'entrées au centre. L'OFT n'a montré aucune différence entre les groupes lors de l'analyse du temps d'allongement du tronc et du nombre d'allongement effectué. Ceci signifie que l'activation centrale prolongée de GPR120 à l'aide d'une pompe osmotique inhibe le comportement de type anxieux des souris placées sous une diète riche en gras et pourrait être une voie thérapeutique à effet anxiolytique/antidépresseur. Cet effet anxiolytique causé par l'injection de l'agoniste du GPR120 au niveau central pourrait être également lié à l'activation du Mfsd2a (Major facilitator superfamily domain-containing protein 2 a) qui est exprimé exclusivement dans l'endothélium des micro-vaisseaux sanguins de la BHE et qui est le principal transporteur pour l'ADH dans le cerveau [397].

La prise de poids conduisant à l'obésité et aux troubles de l'humeur représente une des causes majeures de morbidité et de l'incapacité fonctionnelle. La revue de la littérature sur les études humaines indique que l'augmentation aiguë de la quantité de gras dans l'alimentation conduit à la fois aux changements métaboliques [536] et aux comportementaux de l'humeur [537] tels que la dépression [538, 539]. La recension des écrits sur les études cliniques mettent également l'emphase sur les symptômes et conséquences des troubles anxieux pouvant non seulement augmenter l'appétit [540] mais également stimuler une forte envie de manger des aliments riches en gras et en sucre [541]. Parmi ces troubles de l'humeur, le comportement de type anxieux est une des conditions psychiatriques qui se retrouve plus fréquemment dans les pays développés et pouvant affecter un quart de la population au cours de leur durée de vie [542]. Les preuves pouvant affirmer qu'il y ait une interrelation entre l'obésité et les troubles de type anxieux chez l'homme sont par contre controversées puisque certaines études ont identifié une association positive entre ces deux conditions alors que d'autres n'ont observé

aucune relation significative. Toutefois, dans une revue systématique de la littérature, Garipey et al. ont recherché le lien entre l'obésité et les troubles anxieux dans la population générale. Ils ont conclu que dans l'ensemble, à un niveau modéré, il existe des preuves d'association positive entre l'obésité et les troubles anxieux et que la prévalence des troubles anxieux est significativement augmentée par l'incidence de l'obésité [543]. Il est important de noter ici que les auteurs ont néanmoins des réserves tout comme d'autres chercheurs en concluant que de multiples facteurs environnementaux tels que l'exposition aux régimes obésogènes denses en calories et le manque d'activité physique peuvent aussi contribuer au développement ou au maintien des troubles anxieux et dépressifs [544]. Le recensement des publications rapporte que l'obésité peut conduire à des troubles anxieux par le biais de diverses voies. D'une part, la discrimination et la stigmatisation liées au surpoids peuvent être profondément pénibles pour les personnes obèses [545] et d'autre part, l'effet négatif de l'obésité sur la santé et la qualité de la vie pourrait être un élément déterminant à son développement [546]. Ces deux possibilités pourraient conduire à des troubles anxieux.

Les résultats des études provenant de notre laboratoire ont démontré chez les rongeurs le rôle du gain de poids dans l'apparition de comportements de type dépressif, suite à une alimentation riche en gras [547]. D'autres chercheurs ont également démontré une augmentation des comportements de type anxieux et de désespoir chez les souris soumises à une diète obésogène induisant l'obésité (DIO) [548]. Plus spécifiquement, nous avons démontré que ces troubles comportementaux étaient attribuables à un régime alimentaire riche en gras saturés comparativement à un régime alimentaire isocalorique riche en gras monoinsaturés ou à un régime faible en gras [549]

Selon mon point de vue, il existe une relation entre la prise de poids, l'anxiété et la dépression. On ne peut pas confirmer qu'il s'agit d'une relation de cause à effet mais plutôt d'une forte corrélation. D'autres études humaines sont donc nécessaires afin de mieux statuer sur cette relation.

## **5.5. Forces et faiblesses de cette étude**

Les résultats du premier article de notre recherche plaident en faveur de l'utilité et des bienfaits des AGPI dans le modèle animal. À notre connaissance nous sommes les premiers à évaluer le rôle des AGPI N-3 pendant la période périnatale sur la motivation alimentaire. Les résultats du deuxième article soutiennent le potentiel effet bénéfique d'un agoniste spécifique du GPR120 dans le traitement de l'obésité et du diabète. À notre connaissance également, nous sommes les premiers à évaluer l'effet d'une stimulation pharmacologique aiguë et chronique au niveau central du GPR120 sur la balance énergétique et l'état émotionnel de type anxiété.

Nous sommes conscientes que cette recherche constitue une base solide des études cliniques pour l'avenir et le bien-être des humains. Nous sommes également conscientes que la plus grande limite de notre étude est l'extrapolation de nos résultats obtenus avec des souris, particulièrement les C57B16, à l'humain.

Dans notre première étude, l'un des plus grands obstacles fut de n'avoir qu'utilisé que des souris mâles. Nos résultats ne peuvent ainsi être généralisés aux femelles en raison des variations biologiques intrinsèques telles que les cycles hormonaux de celles-ci qui requièrent des techniques plus spécifiques. De plus, l'impact disproportionné que peuvent avoir certaines maladies liées au sexe est également un facteur à considérer.

Dans notre deuxième étude, pendant la stimulation aiguë, nous ne pouvions limiter les effets qui pourraient être liés aux nombres d'injections reçues à répétition par chaque animal (véhicule, faible et forte concentration) ou au fait que les animaux ne soient pas tout à fait « naïfs » malgré les manipulations du sham pendant 2 jours consécutifs avant l'administration du véhicule ou des agonistes. En ce qui concerne la quantité de drogue injectée, nous nous sommes basés sur la masse totale injectée à chaque souris (soit 1  $\mu$ L d'une solution à 0,1  $\mu$ M et 1  $\mu$ M par souris) et non sur la masse spécifique de l'agoniste. Or, chaque agoniste a sa propre masse moléculaire; 524.62518 g/mol pour le TAK-875 et 364.4g/mol pour le GPR120 III, une différence de 35 % de masse molaire existe entre les 2 agonistes. Il se pourrait que ces agonistes aient des affinités différentes et selon la quantité de récepteurs stimulés nous devons nous attendre à des résultats différents pour une même concentration administrée. Finalement, l'utilisation de l'agoniste GPR120 utilisé a une très faible affinité pour les récepteurs du GPR40 qui ont également été détecté dans certaines zones du cerveau [67, 379]. Pour distinguer les effets liés soit à l'agoniste du GPR120 ou à l'agoniste du GPR40, nous avons jugé bon d'utiliser un agoniste spécifique de GPR40 dans un groupe témoin. Compte tenu que l'agoniste de GPR40 n'a eu aucun effet sur la prise alimentaire, nous avons déduit que l'effet de réduction de prise alimentaire déclenché par l'agoniste de GPR120 est probablement occasionné par l'activation spécifique des récepteurs GPR120 dans le cerveau. Le manque d'un groupe expérimental lors de l'injection chronique sous diète hypocalorique (LFD-GPR120) nous permettrait de mieux évaluer l'effet de l'agoniste sous diète hypocalorique. L'absence de ce groupe dans notre étude s'explique tout simplement du fait que nous avons voulu évaluer l'effet du GPR120 sur la prise alimentaire dans un contexte obésogène. Des

perspectives futures avec de plus grandes cohortes se pencheront certainement sur ce groupe contrôle.



## **Chapitre 6 : Conclusion générale et perspectives**

## 6.1. Conclusion

Compte tenu de la prévalence de l'obésité dans les populations occidentales, la grande majorité des études pharmacologiques visent à découvrir de nouveaux médicaments efficaces pouvant être utilisés en tant que traitement pour l'un des problèmes majeurs en santé publique qu'est l'obésité. Quelques médicaments ont été mis sur le marché dans le passé afin de modifier la sensation de satiété. Tel est le cas du rimonabant, un antagoniste du cannabinoïde type 1 receptor (CB1) qui vient diminuer la consommation de nourriture [550]. Malheureusement, ce médicament a été retiré du marché en raison des effets secondaires psychiatriques graves tels que la dépression et les tendances suicidaires [551]. Heureusement, il existe aujourd'hui un tournant important dans le domaine de la recherche en ce qui concerne le traitement de l'obésité. Il existe en effet aujourd'hui un lien étroit entre l'obésité et la dépression et cette approche thérapeutique intégrant ces deux pathologies est très bien accueillie. Malgré les efforts déployés dans le développement des médicaments ou des vaccins contre l'obésité, la meilleure solution pour lutter contre le développement de ce fléau demeure la prévention se traduisant par l'activité physique quotidienne et un régime alimentaire équilibré. Mais chez certaines personnes ces méthodes de prévention et de traitement de l'obésité ne fonctionnent pas. Une vision globale, dynamique et multidisciplinaire nous permettant de comprendre les différents mécanismes physico-chimiques et biologiques du contrôle de la régulation de la faim, est selon nos recherches, la meilleure voie pour combattre ce fléau que représente l'obésité et le diabète de type 2.

Cette étude nous a permis dans un premier temps de démontrer que les AGPI N-3 pendant la période périnatale sont très importants pour la régulation de l'appétit et de l'humeur à l'âge adulte. Dans un deuxième temps, elle nous a permis d'effectuer une percée par laquelle

ces acides gras polyinsaturés pourraient jouer un rôle anorexigène dans le cerveau. La véritable question intéressante à se poser est de savoir si l'activation de ce récepteur aura un effet bénéfique au sein d'une large population de patients souffrant d'obésité et/ou de diabète de type 2. En combinaison avec leur action de sensibilisation à l'insuline, de contrôle à la fois sur les aspects de la neuroprotection, la neuroinflammation, et la récompense pour la nourriture; via l'activation du GPR120; les AGPI N-3 démontrent bien qu'ils sont des nutriments essentiels. Nos données nous permettent de faire la lumière sur une nouvelle solution, non invasive, rentable, économique, un ciblage d'essai thérapeutique à titre d'un agoniste du GPR120 pouvant traverser la barrière hématoencéphalique en tant que nouvelle approche thérapeutique polyvalente pour le traitement simultané de l'obésité et de diabète de type 2.

## 6.2. Perspectives

La présente thèse rédigée a été créée afin d'améliorer nos connaissances sur le rôle des AGPI de la famille des N-3 sur la balance énergétique, la motivation alimentaire, l'anxiété, la dépression et l'implication du GPR120. En raison de son activité biologique et de sa distribution dans différents tissus, même au niveau du système nerveux central, GPR120 est une cible thérapeutique attrayante pour l'obésité et le diabète de type 2. Toutefois, de nouvelles recherches sur l'utilisation d'un potentiel antagoniste des récepteurs GPR120 et sur la régulation de la balance énergétique serait intéressante puisqu'une étude a récemment démontré l'effet d'un antagoniste des GPR120 sur les cellules de carcinome colorectal [552]. En supposant que les antagonistes des GPR120 vont afficher une haute sélectivité équivalente à celle déjà décrite pour les antagonistes des GPR40, il serait également d'une grande utilité d'approfondir les rôles et contributions des GPR120 au niveau du système nerveux central à l'égard du contrôle de la balance énergétique et des troubles émotionnels.

Il est bien connu que les AGPI suppriment l'expression des gènes de la lipogenèse induisant à la fois la transcription de gènes codant pour des protéines de l'oxydation des lipides et de la thermogenèse [553, 554]. Il serait souhaitable à l'avenir de pouvoir doser les facteurs de transcription, particulièrement le peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), qui est activé par les AGPI [555, 556].

Une étude a récemment démontré que la supplémentation en N-3 chez des souris sauvages entraînait une amélioration significative de la tolérance au glucose par rapport à la fois aux souris sauvages et knock-out (KO) placées sous HFD, mais que cette supplémentation en N-3 n'avait aucun effet sur les souris GPR120 KO [557]. D'autres études sur des souris KO placées sous HFD sont néanmoins nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes par

lesquels ce récepteur permet de moduler l'homéostasie du glucose dans l'organisme entier et plus particulièrement au niveau du système nerveux central. Il serait également intéressant de mieux caractériser la présence du GPR120 dans le cerveau (puisque nous avons démontré dans notre laboratoire l'expression de son ARNm dans certaines zones spécifiques du cerveau). Ceci pourrait se faire en identifiant les types de cellules exprimant le GPR120 en utilisant la technique d'hybridation in situ. Cette technique nous permettra de réaliser un système d'inactivation génétique Cre-Lox, afin de générer des souris dans lesquelles les sites LoxP flanquent le gène GPR120 (« souris GPR120-floxé » où le gène serait invalide). On pourrait ainsi donc soumettre les souris sous HFD ou sous diète N-3 adéquat et N-3 déficitaire. On pourrait du même coup grâce à cette technique avoir des souris GPR120 KO conditionnel (à savoir une invalidation du gène au niveau de certaines cellules spécifiques du cerveau, par exemple les neurones, les astrocytes, la microglie etc. ...)

La neuroinflammation est une caractéristique précoce commune à la plupart des pathologies périphériques et centrales, connue pour modifier les effets cognitifs, en particulier la mémoire spatiale [558]. Au niveau du cerveau, elle est caractérisée par la synthèse et la libération de médiateurs pro-inflammatoires connus afin de contrôler la fonction neuronale [559]. Les troubles dans la régulation de l'expression de cytokines, de chimiokines et des modifications dans les niveaux de sécrétion de la leptine représentent des changements pouvant moduler la réponse immunitaire et inflammatoire au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire et avoir un impact sur le poids, l'appétit et le niveau de satiété [560].

L'axe hypothalamo-hypophysique surrénalien, en abrégé HPA pour hypothalamo-hypophysique adrénale, est formé par l'hypothalamus, l'hypophyse et la glande surrénale. Sachant que la libération aiguë ou chronique des hormones liées au stress (cortisol,

glucocorticoïdes et l'adrénaline) entraînent des modifications dans la plasticité neuronale et en particulier au niveau de l'HPA où siègent les structures cérébrales impliquées dans la régulation du stress [561], il serait intéressant de les doser dans notre protocole. Puisque le dysfonctionnement de l'HPA est d'ailleurs impliqué dans plusieurs maladies y compris celles des troubles de l'humeur comme la dépression pouvant se traduire, par une diminution de l'apport en nourriture [562]. Des auteurs rapportent également qu'un dérèglement de cet axe contribue à l'altération de l'appétit et du gain de poids chez les personnes stressées [563].

Il aurait été intéressant dans notre étude de mesurer ces différentes substances et comparer leur expression, particulièrement entre les souris placées sous HFD et LFD avec l'injection chronique du GPR120. Compte tenu que le mécanisme de l'effet anti-inflammatoire de l'ADH implique l'activation du complexe GPR120/ $\beta$ -arrestin-2 dans le cytoplasme, bloquant à son tour l'association TAB1/TAK1 qui est un inducteur de la signalisation pro-inflammatoire en aval [71], il serait intéressant de vérifier par quel mécanisme le GPR120 agit en tant qu'anti-inflammatoire au niveau du cerveau et quels sont les circuits neuronaux concernés dans ce processus. Il serait également intéressant d'utiliser des souris  $\beta$ -arrestin 2 knock-out afin d'évaluer les mécanismes en aval du complexe GPR120/ $\beta$ -arrestin-2 dans le processus inflammatoire.

Il serait enrichissant de procéder à l'activation centrale du GPR120 avec un agoniste pouvant traverser la BHE, dans un modèle de « souris anxieuses ou dépressives » comme le modèle des souris H/Rouen, et évaluer à la fois l'aspect émotionnel et de prise alimentaire. Un tel traitement pourrait ainsi être avantageux afin de diminuer la consommation alimentaire chez les « mangeurs émotionnels » qui consomment des aliments palatables, riches en gras et en sucre pour pallier à leur stress ou leur anxiété.

Nous avons ciblé spécifiquement les récepteurs du GPR120 mais comme il existe une certaine affinité pour le GPR40, il serait souhaitable à l'avenir d'évaluer la quantité de récepteurs GPR40 étant activés lors de cette stimulation spécifique des récepteurs GPR120.

Il serait important à l'avenir de faire non seulement un profilage de la distribution tissulaire de GPR120 et de mener des études pour déterminer comment le récepteur lui-même est réglementé au niveau du corps entier et au niveau de chaque tissu individuellement. En plus du profilage de distribution tissulaire, un profilage génétique au sein des populations à risque serait important, puisque les données suggèrent qu'il est possible de développer des stratégies préventives de l'obésité en identifiant les personnes porteuses du gène p.R27OH, sensibles à l'obésité[70].

Puisque nous avons mis en évidence l'expression de l'ARNm du GPR120 au niveau du NAc et qu'une stimulation aigüe centrale du GPR120 entraîne une réduction de la motivation alimentaire pour les aliments palatables ; des études ultérieures demeurent toujours nécessaires afin de déterminer si la réduction du comportement de motivation alimentaire se produit à travers des actions de signalisation dans le NAc.

## Bibliographie

1. Organisation Mondiale de la Santé, *OBÉSITÉ : prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale*, in *Rapport d'une consultation de l'OMS*, S.d.r.t. #894, Editor. 1997, OMS: Genève, Suisse. p. 300.
2. Organisation Mondiale de la Santé. *Obésité et surpoids*. Aide mémoire # 311 2015 [cited 2015 1er Novembre ]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/fr/>.
3. Shields, M., et al., *Prévalence de l'obésité chez les adultes au Canada et aux États-Unis*. 2011, Hyattsville, Md.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics.
4. santé, O.M.d.l. *Obésité et surpoids*. Aide mémoire 2006 [cited 2006 Septembre].
5. Ogden, C.L., et al., *Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000*. JAMA, 2002. **288**(14): p. 1728-32.
6. Davis, J.F., et al., *Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat*. Behav Neurosci, 2008. **122**(6): p. 1257-63.
7. Teegarden, S.L., A.N. Scott, and T.L. Bale, *Early life exposure to a high fat diet promotes long-term changes in dietary preferences and central reward signaling*. Neuroscience, 2009. **162**(4): p. 924-32.
8. Serdula, M.K., et al., *Do obese children become obese adults? A review of the literature*. Prev Med, 1993. **22**(2): p. 167-77.
9. Coutinho, T., et al. *Combining Body Mass Index With Measures of Central Obesity in the Assessment of Mortality in Subjects With Coronary Disease: Role of Normal Weight Central Obesity*. 2013; Available from: [http://p1kitapp01cur.adm.ku.dk:8081/portal/da/publications/combining-body-mass-index-with-measures-of-central-obesity-in-the-assessment-of-mortality-in-subjects-with-coronary-disease\(96d19f93-643f-4f3e-bbe3-401278c10ca1\).html](http://p1kitapp01cur.adm.ku.dk:8081/portal/da/publications/combining-body-mass-index-with-measures-of-central-obesity-in-the-assessment-of-mortality-in-subjects-with-coronary-disease(96d19f93-643f-4f3e-bbe3-401278c10ca1).html).
10. Mandavia Ch, P.L.D.V.S.J.R., *Over-nutrition and metabolic cardiomyopathy*. Metabolism: clinical and experimental, 2012. **61**(9): p. 1205-10.
11. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes*. J. Clin. Invest. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(5): p. 1111-1119.
12. Goldstein, B.I., et al., *Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature*. The Journal of clinical psychiatry, 2009. **70**(8): p. 1078-90.
13. Després, J.P. and I. Lemieux, *Abdominal obesity and metabolic syndrome*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 881-7.
14. Colman, R., C. Dodds, and J. Wilson, *Cost of obesity*. Quebec. GPI Atlantic (Indice de progrès véritable-Atlantique), 2000.
15. Lakhan, S.E. and K.F. Vieira, *Nutritional therapies for mental disorders*. Nutr J, 2008. **7**: p. 2.
16. Roberts, R.E., et al., *Prospective association between obesity and depression: evidence from the Alameda County Study*. International journal of obesity and related metabolic



- disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity, 2003. **27**(4): p. 514-21.
17. Burdge, G.C., A.E. Jones, and S.A. Wootton, *Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men\**. Br J Nutr, 2002. **88**(4): p. 355-63.
  18. Offord, D.R., et al., *One-year prevalence of psychiatric disorder in Ontarians 15 to 64 years of age*. Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie, 1996. **41**(9): p. 559-63.
  19. Kessler, R.C., Nelson, C.B., and K.A. McGonagle. *THE EPIDEMIOLOGY OF CO-OCCURRING ADDICTIVE AND MENTAL DISORDERS: Implications for Prevention and Service Utilization*. American Journal of Orthopsychiatry 1996; Available from: <http://hdl.handle.net/2027.42/73747>.
  20. Somers, J.M., et al., *Prevalence and incidence studies of anxiety disorders: a systematic review of the literature*. Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie, 2006. **51**(2): p. 100-13.
  21. Organisation Mondiale de la Santé. *Depression*. center media 2015 [cited 2015 1er Novembre]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>.
  22. Kessler, R.C., et al., *Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication*. Archives of general psychiatry, 2005. **62**(6): p. 617-27.
  23. Organisation Mondiale de la Santé, *Mental health, in Programmes and projects*. 2012.
  24. Luppá, M., et al., *Health Service Utilization and Costs of Depressive Symptoms in Late Life - A Systematic Review*. Curr Pharm Des, 2012: p. [Epub ahead of print]
  25. Opel, N., et al., *Obesity and major depression: Body-mass index (BMI) is associated with a severe course of disease and specific neurostructural alterations*. Psychoneuroendocrinology, 2015. **51**: p. 219-26.
  26. Jokela, M., et al., *Association of metabolically healthy obesity with depressive symptoms: pooled analysis of eight studies*. Molecular psychiatry, 2014. **19**(8): p. 910-4.
  27. Hamer, M., G.D. Batty, and M. Kivimaki, *Risk of future depression in people who are obese but metabolically healthy: the English longitudinal study of ageing*. Mol Psychiatry Molecular Psychiatry, 2012. **17**(9): p. 940-945.
  28. Nousen, E.K., J.G. Franco, and E.L. Sullivan, *Unraveling the Mechanisms Responsible for the Comorbidity between Metabolic Syndrome and Mental Health Disorders*. Neuroendocrinology, 2013. **98**(4): p. 254-266.
  29. Pan, A., et al., *Bidirectional association between depression and obesity in middle-aged and older women*. Int J Obes Relat Metab Disord International Journal of Obesity, 2011. **36**(4): p. 595-602.
  30. Sharma, S. and S. Fulton, *Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry*. International journal of obesity (2005), 2013. **37**(3): p. 382-9.
  31. Ulrich-Lai, Y.M., et al., *Stress exposure, food intake and emotional state*. Stress (Amsterdam, Netherlands), 2015. **18**(4): p. 381-99.
  32. Agence de santé publique du, C. *Le diabète au Canada perspective de santé publique sur les faits et chiffres*. 2011; Available from: <http://epe.lac->

[bac.gc.ca/100/201/301/liste\\_hebdomadaire/2012/electronique/w12-03-U-F.html/collections/collection\\_2012/aspc-phac/HP35-25-2011-fra.pdf](http://bac.gc.ca/100/201/301/liste_hebdomadaire/2012/electronique/w12-03-U-F.html/collections/collection_2012/aspc-phac/HP35-25-2011-fra.pdf).

33. Organisation Mondiale de la Santé, *Régime alimentaire, nutrition et prévention des maladies chroniques. Rapport d'une consultation OMS/FAO d'experts*, in *Série de rapports techniques*. 2003.
34. Adult Mental Health Division, B.C.M.o.H. *The Provincial Strategy Advisory Committee for Anxiety Disorders. A Provincial Anxiety Disorders* 2002.
35. Dong, C., L.E. Sanchez, and R.A. Price, *Relationship of obesity to depression: a family-based study*. International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity, 2004. **28**(6): p. 790-5.
36. Fulton, S., *Appetite and reward*. Frontiers in Neuroendocrinology, 2010. **31**(1): p. 85-103.
37. Fantino, M., *Role of sensory input in the control of food intake*. Journal of the autonomic nervous system, 1984. **10**(3-4).
38. Kissileff, H.R. and T.B. Van Itallie, *Physiology of the control of food intake*. Annual review of nutrition, 1982. **2**: p. 371-418.
39. Cavalli-Sforza, L.T.R., A.; de Boer, A. S.; Darnton-Hill, I. *Nutritional aspects of changes in disease patterns in the Western Pacific region*. 1996; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2486917>.
40. Drewnowski, A. and B.M. Popkin, *The nutrition transition: new trends in the global diet*. Nutr Rev, 1997. **55**(2): p. 31-43.
41. Qi, K.K.C.J.L.Z.G.P.Z.M.Q.W.J., *Effect of dietary 6/3 on growth performance, carcass traits, meat quality and fatty acid profiles of Beijing-you chicken*. JPN Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2010. **94**(4): p. 474-485.
42. Uauy, R. and A.D. Dangour, *Nutrition in Brain Development and Aging: Role of Essential Fatty Acids*. Nutrition Reviews, 2006. **64**(5): p. S24-S33.
43. Chen, C.T., Z. Liu, and R.P. Bazinet, *Rapid de-esterification and loss of eicosapentaenoic acid from rat brain phospholipids: an intracerebroventricular study*. Journal of neurochemistry, 2011. **116**(3): p. 363-73.
44. Chen, C.T., et al., *Rapid beta-oxidation of eicosapentaenoic acid in mouse brain: an in situ study*. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 2009. **80**(2-3).
45. Su, H.M., *Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2010. **21**(5): p. 364-373.
46. Gebauer, S.K., et al., *n-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits*. The American journal of clinical nutrition, 2006. **83**(6).
47. Mozaffarian, D. and E.B. Rimm, *Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits*. JAMA, 2006. **296**(15): p. 1885-99.
48. Grosso, G., et al., *Role of omega-3 fatty acids in the treatment of depressive disorders: a comprehensive meta-analysis of randomized clinical trials*. PloS one, 2014. **9**(5).
49. Féart, C., et al., *La sévérité de la symptomatologie dépressive est inversement associée à l'acide eicosapentaénoïque (EPA) plasmatique chez les sujets âgés de Bordeaux : étude 3-cités*. RESPE Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique: Supplement, 2008. **56**(5): p. 314-314.

50. Buydens-Branchev, L., M. Branchev, and J.R. Hibbeln, *Associations between increases in plasma n-3 polyunsaturated fatty acids following supplementation and decreases in anger and anxiety in substance abusers*. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry, 2008. **32**(2): p. 568-75.
51. Kushner, M.G., et al., *Follow-up study of anxiety disorder and alcohol dependence in comorbid alcoholism treatment patients*. Alcoholism, clinical and experimental research, 2005. **29**(8): p. 1432-43.
52. Willinger, U., et al., *Anxiety as a predictor of relapse in detoxified alcohol-dependent patients*. Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire), 2002. **37**(6).
53. Levant, B., T.J. Zarcone, and S.C. Fowler, *Developmental effects of dietary n-3 fatty acids on activity and response to novelty*. Physiol Behav, 2010. **101**(1): p. 176-83.
54. Sinha, R.A., et al., *Anti-apoptotic role of omega-3-fatty acids in developing brain: perinatal hypothyroid rat cerebellum as apoptotic model*. Int J Dev Neurosci, 2009. **27**(4): p. 377-83.
55. Markhus, M.W., et al., *Low omega-3 index in pregnancy is a possible biological risk factor for postpartum depression*. PloS one, 2013. **8**(7).
56. Layé, S., *Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being*. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 2010. **82**(4-6).
57. Leaf, A., *Clinical Prevention of Sudden Cardiac Death by n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Mechanism of Prevention of Arrhythmias by n-3 Fish Oils*. Circulation Circulation, 2003. **107**(>21): p. 2646-2652.
58. Storlien, L.H., A.J. Hulbert, and P.L. Else, *Polyunsaturated fatty acids, membrane function and metabolic diseases such as diabetes and obesity*. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 1998. **1**(6): p. 559-63.
59. Liperoti, R., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and depression: a review of the evidence*. Current pharmaceutical design, 2009. **15**(36): p. 4165-72.
60. Cornall, L.M., et al., *The therapeutic potential of GPR43: a novel role in modulating metabolic health*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(24): p. 4759-70.
61. Cornall, L.M., et al., *Is GPR119 agonism an appropriate treatment modality for the safe amelioration of metabolic diseases?* Expert Opin Investig Drugs, 2013. **22**(4): p. 487-98.
62. Yonezawa, T., et al., *Free fatty acids-sensing G protein-coupled receptors in drug targeting and therapeutics*. Current medicinal chemistry, 2013. **20**(31): p. 3855-71.
63. Hirasawa A, T.K.A.T.K.S.A.T.Y.M.S.Y.M.S.T.G., *Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120*. Nature medicine, 2005. **11**(1): p. 90-4.
64. Itoh, Y., et al., *Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 173-6.
65. Edfalk, S., P. Steneberg, and H. Edlund, *Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion*. Diabetes, 2008. **57**(9): p. 2280-7.
66. Liou, A.P., et al., *The G-Protein-Coupled Receptor GPR40 Directly Mediates Long-Chain Fatty Acid-Induced Secretion of Cholecystokinin*. Gastroenterology, 2011. **140**(3): p. 903-912.e4.
67. Ma, D., et al., *Expression of free fatty acid receptor GPR40 in the neurogenic niche of adult monkey hippocampus*. Hippocampus, 2008. **18**(3): p. 326-33.

68. Ma, D., et al., *Expression of free fatty acid receptor GPR40 in the central nervous system of adult monkeys*. Neuroscience Research Neuroscience Research, 2007. **58**(4): p. 394-401.
69. Gotoh, C., et al., *The regulation of adipogenesis through GPR120*. YBBRC Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **354**(2): p. 591-597.
70. Ichimura, A., et al., *Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human*. Nature, 2012. **483**(7389): p. 350-354.
71. Oh, D.T., S. Bae, E.J. Imamura, T. Morinaga, H. Fan, W. Li, P. Lu, WJ. Watkins, SM. Olefsky, JM., *GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects*. Cell, 2010. **142**(5): p. 687-98.
72. Tanaka, T., et al., *Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120*. Arch Pharmacol, 2008. **377**(4-6): p. 523-7.
73. Gong, Z., et al., *G protein-coupled receptor 120 signaling regulates ghrelin secretion in vivo and in vitro*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014. **306**(1): p. 28-35.
74. Paulsen, S.J., et al., *Expression of the fatty acid receptor GPR120 in the gut of diet-induced-obese rats and its role in GLP-1 secretion*. Plos One, 2014. **9**(2).
75. Suckow, A.T., et al., *Alteration of the glucagon axis in GPR120 (FFAR4) knockout mice: a role for GPR120 in glucagon secretion*. Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(22): p. 15751-63.
76. Bonnefond, A., et al., *O53 Laltération du récepteur des acides gras insaturés de type omega-3 GPR120 entraîne une obésité chez l'Homme et la Souris*. DIABET Diabetes and Metabolism, 2012. **38**: p. A13.
77. Cintra, D.E., et al., *Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity*. PloS one, 2012. **7**(1): p. e30571.
78. Wellhauser, L. and D.D. Belsham, *Activation of the omega-3 fatty acid receptor GPR120 mediates anti-inflammatory actions in immortalized hypothalamic neurons*. J Neuroinflammation, 2014. **11**(1): p. 60.
79. Tappy, L. and É. Guenat, *Dépenses d'énergie, composition corporelle et activité physique chez l'homme*. 2000.
80. Westerterp, K.R., *Diet induced thermogenesis*. Nutr Metab Lond Nutrition & Metabolism, 2004. **1**(1): p. 1-5.
81. Glick, Z., G.A. Bray, and R.J. Teague, *Effect of prandial glucose on brown fat thermogenesis in rats: possible implications for dietary obesity*. The Journal of nutrition, 1984. **114**(2): p. 286-91.
82. Caspersen, C.J., K.E. Powell, and G.M. Christenson, *Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research*. Public health reports (Washington, D.C. : 1974), 1985. **100**(2).
83. Cabanac, M. and M. Russek, *Régulation et contrôle en biologie*. Vol. Chap.4 et Chap.5. 1982, Québec: Presses de l'Université Laval.
84. Daddoun, F. and M. romon, *Régulation physiologique du comportement alimentaire*. CND Cahiers de Nutrition et de Dietetique, 2004. **39**(6): p. 422-428.
85. Finlayson G, H.J., King N, Blundell J. *The regulation of food intake in humans*. 2008 [cited 2010 Retrieved 23 September]; [www.endotext.org/obesity/obesity7.3/obesity7-3.html](http://www.endotext.org/obesity/obesity7.3/obesity7-3.html). Available from: <http://eprints.qut.edu.au/34374/>.
86. Migrenne, S., et al., *Importance of the gut-brain axis in the control of glucose homeostasis*. Current opinion in pharmacology, 2006. **6**(6): p. 592-7.

87. Cannon, W.B., *The wisdom of the body*. 1963, New York: Norton.
88. Grill, H.J. and R. Norgren, *The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats*. Brain research, 1978. **143**(2): p. 263-79.
89. McFarland, D. and R. Zayan, *Le comportement animal : psychobiologie, éthologie et évolution*. 3ème ed. 2009, Bruxelles: De Boeck.
90. Broberger, C., *Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks*. JOIM Journal of Internal Medicine, 2005. **258**(4): p. 301-327.
91. Grill, H.J. and J.M. Kaplan, *The Neuroanatomical Axis for Control of Energy Balance*. Frontiers in Neuroendocrinology Frontiers in Neuroendocrinology, 2002. **23**(1): p. 2-40.
92. Konturek, P., et al., *Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanisms and clinical implications*. Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society, 2005. **56**: p. 5-25.
93. Lemaire, J.J., et al., *White matter connectivity of human hypothalamus*. Brain Res. Brain Research, 2011. **1371**(C): p. 43-64.
94. Saper, C.B., *Hypothalamic connections with the cerebral cortex*. Progress in brain research, 2000. **126**: p. 39-48.
95. Anand, B.K. and J.R. Brobeck, *Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), 1951. **77**(2): p. 323-4.
96. Hetherington, A.W. and S.W. Ranson, *Hypothalamic lesions and adiposity in the rat*. AR The Anatomical Record, 1940. **78**(2): p. 149-172.
97. Berridge, K.C., *Liking and wanting food rewards: Brain substrates and roles in eating disorders*. Physiology & Behavior Physiology & Behavior, 2009. **97**(5): p. 537-550.
98. Sørensen, L.B., et al., *Effect of sensory perception of foods on appetite and food intake: a review of studies on humans*. International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity, 2003. **27**(10): p. 1152-66.
99. Yeomans, M.R., J.E. Blundell, and M. Leshem, *Palatability: response to nutritional need or need-free stimulation of appetite?* The British journal of nutrition, 2004. **92**: p. 3-14.
100. Berthoud, H.R., *Interactions between the "cognitive" and "metabolic" brain in the control of food intake*. Physiology & Behavior, 2007. **91**(5): p. 486-498.
101. Foster, G., *The behavioral approach to treating obesity*. American heart journal, 2006. **151**(3): p. 625-7.
102. la Fleur, S.E., et al., *Choice of lard, but not total lard calories, dampens adrenocorticotropin responses to restraint*. Endocrinology, 2005. **146**(5): p. 2193-9.
103. Pelchat, M.L., *Of human bondage: food craving, obsession, compulsion, and addiction*. Physiology & behavior, 2002. **76**(3): p. 347-52.
104. Erlanson-Albertsson, C., *How palatable food disrupts appetite regulation*. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 2005. **97**(2): p. 61-73.
105. Kelley, A.E., *Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2004. **27**(8): p. 765-776.
106. Bozarth, M.A. and R.A. Wise, *Heroin reward is dependent on a dopaminergic substrate*. Life sciences, 1981. **29**(18): p. 1881-1886.

107. Papez, J.W., *A proposed mechanism of emotion*. Archives of Neurology & Psychiatry, 1937. **38**(4): p. 725-743.
108. Berridge Kc, R.T.E., *What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?* Brain research. Brain research reviews, 1998. **28**(3): p. 309-69.
109. Berridge Kc, R.T.E., *Parsing reward*. Trends in neurosciences, 2003. **26**(9): p. 507-13.
110. Olds, J., *Satiation effects in self-stimulation of the brain*. Journal of Comparative and Physiological Psychology Journal of Comparative and Physiological Psychology, 1958. **51**(6): p. 675-678.
111. Organisation Mondiale de la Santé, *Mise en œuvre de la stratégie de l'OMS pour l'alimentation, l'exercice physique et la santé*. 2008.
112. Coutinho G.V.P, C.F.R.T.M.S.F.J.Z.D.L.R.S.R.P.A.A.I.-S.L.M., *Intrauterine protein restriction combined with early postnatal overfeeding was not associated with adult-onset obesity but produced glucose intolerance by pancreatic dysfunction*. Nutr. Metab. Nutrition and Metabolism, 2013. **10**(1).
113. Drewnowski, A., *Obesity, diets, and social inequalities*. Nutrition reviews, 2009. **67**: p. 36-9.
114. Winter, Y.S.R.B.T.O., *Genetic Determinants of Obesity and Related Vascular Diseases*. Vitamins and Hormones, 2013. **91**: p. 29-48.
115. Delrue, M.A.M.J.L., *Fat chance: genetic syndromes with obesity*. CGE Clinical Genetics, 2004. **66**(2): p. 83-93.
116. Hasnain M, V.W.V.H.B., *Weight gain and glucose dysregulation with second-generation antipsychotics and antidepressants: a review for primary care physicians*. Postgraduate medicine, 2012. **124**(4): p. 154-67.
117. Stratakis, C.A., *Cushing syndrome in pediatrics*. Endocrinology and metabolism clinics of North America, 2012. **41**(4): p. 793-803.
118. Carpené, C., et al., *Expanding role for the apelin/APJ system in physiopathology*. Journal of physiology and biochemistry, 2007. **63**(4): p. 358-373.
119. Pénicaud, L., S. Meillon, and L. Brondel, *Leptin and the central control of feeding behavior*. Biochimie Biochimie, 2012. **94**(10): p. 2069-2074.
120. Shizgal, P., S. Fulton, and B. Woodside, *Brain reward circuitry and the regulation of energy balance*. International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity, 2001. **25 Suppl 5**: p. S17-21.
121. Leroy, P., et al., *Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(5): p. 2365-8.
122. Lu, X.Y., *The leptin hypothesis of depression: a potential link between mood disorders and obesity?* Current opinion in pharmacology, 2007. **7**(6): p. 648-52.
123. Considine, R.V., et al., *Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans*. The New England journal of medicine, 1996. **334**(5): p. 292-5.
124. Maffei, M., et al., *Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects*. Nature medicine, 1995. **1**(11): p. 1155-61.
125. Tartaglia, L.A., et al., *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. Cell, 1995. **83**(7): p. 1263-71.

126. Dornonville de la Cour, C., et al., *A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control*. Regulatory peptides, 2001. **99**(2-3): p. 2-3.
127. King, S.J., et al., *Motivation to obtain preferred foods is enhanced by ghrelin in the ventral tegmental area*. Hormones and Behavior, 2011. **60**(5): p. 572-580.
128. Harrold, J.A., et al., *CNS regulation of appetite*. Neuropharmacology, 2012. **63**(1): p. 3-17.
129. Woods, S.C., et al., *Food intake and the regulation of body weight*. Annual review of psychology, 2000. **51**: p. 255-77.
130. Woods, S.C., et al., *Insulin and the Blood-Brain Barrier*. Current pharmaceutical design., 2003. **9**(10): p. 795.
131. Air, E.L., et al., *Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity*. Nature medicine, 2002. **8**(2): p. 179-83.
132. Baskin, D.G., et al., *Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight*. Brain research., 1999. **848**(1): p. 114.
133. Castillo, M., A. Scheen, and P. Lefebvre, *Amylin/islet amyloid polypeptide: biochemistry, physiology, patho-physiology*. Diabete & metabolisme, 1995. **21**(1): p. 3-25.
134. Ludvik, B., et al., *Amylin: history and overview*. Diabetic medicine, 1997. **14**(S2): p. S9-S13.
135. Banks, W.A. and A.J. Kastin, *Differential permeability of the blood-brain barrier to two pancreatic peptides: insulin and amylin*. Peptides, 1998. **19**(5): p. 883-889.
136. Rushing, P.A., et al., *Amylin: A Novel Action in the Brain to Reduce Body Weight\**. Endocrinology, 2000. **141**(2): p. 850-850.
137. Small, C.J. and S.R. Bloom, *Gut hormones and the control of appetite*. Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 2004. **15**(6): p. 259-63.
138. Van Ree, J.M., et al., *Endogenous opioids and reward*. European journal of pharmacology, 2000. **405**(1-3): p. 1-3.
139. Glass, M.J., et al., *The effect of naloxone on food-motivated behavior in the obese Zucker rat*. Psychopharmacology Psychopharmacology, 1999. **141**(4): p. 378-384.
140. Le Magnen, J., et al., *Pain modulating and reward systems: A single brain mechanism?* Pharmacology Biochemistry and Behavior Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1980. **12**(5): p. 729-733.
141. Kelley, A.E., et al., *Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum*. Physiology & Behavior Physiology & Behavior, 2002. **76**(3): p. 365-377.
142. Yeomans, M.R. and R.W. Gray, *Selective effects of naltrexone on food pleasantness and intake*. Physiology & Behavior Physiology & Behavior, 1996. **60**(2): p. 439-446.
143. Del Parigi, A., et al., *Are we addicted to food?* Obesity research, 2003. **11**(4): p. 493-5.
144. Wang, G.J., et al., *Brain dopamine and obesity*. Lancet, 2001. **357**(9253): p. 354-7.
145. Baptista T, L.A.A.A.C.C.d.Q.M.d.M.S.M.J.M.H.L., *Naltrexone does not prevent the weight gain and hyperphagia induced by the antipsychotic drug sulpiride in rats*. Appetite, 2000. **34**(1): p. 77-86.
146. Leibowitz, S.F., *Catecholaminergic mechanisms of the lateral hypothalamus: their role in the mediation of amphetamine anorexia*. Brain research, 1975. **98**(3): p. 529-45.
147. Raimondi, L.A.C.P.A.L.S.G.C.D.G.P.R., *Methylamine-dependent release of nitric oxide and dopamine in the CNS modulates food intake in fasting rats*. British Journal of Pharmacology, 2007. **150**(8): p. 1003-1010.

148. Lawton, C.L., et al., *Serotonergic manipulation, meal-induced satiety and eating pattern: effect of fluoxetine in obese female subjects*. *Obesity research*, 1995. **3**(4): p. 345-56.
149. Halford, J.C. and J.E. Blundell, *Separate systems for serotonin and leptin in appetite control*. *Annals of medicine*, 2000. **32**(3): p. 222-32.
150. Buwalda, B., et al., *Behavioral and physiological responses to stress are affected by high-fat feeding in male rats*. *PHB Physiology & Behavior*, 2001. **73**(3): p. 371-377.
151. Di Marzo, V. and I. Matias, *Endocannabinoid control of food intake and energy balance*. *Nature neuroscience*, 2005. **8**(5): p. 585-9.
152. Pagotto, U., et al., *The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance*. *Endocrine reviews*, 2006. **27**(1): p. 73-100.
153. Mackie, K., *Signaling via CNS cannabinoid receptors*. *Mol. Cell. Endocrinol. Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008. **286**(1-2 SUPPL. 1): p. S60-S65.
154. Wood, J.T., et al., *Dietary docosahexaenoic acid supplementation alters select physiological endocannabinoid-system metabolites in brain and plasma*. *Journal of lipid research*, 2010. **51**(6): p. 1416-23.
155. Horvath, T.L., Z.B. Andrews, and S. Diano, *Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS*. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 2009. **20**(2): p. 78-87.
156. Mayer, J., *Glucostatic mechanism of regulation of food intake*. *The New England journal of medicine*, 1953. **249**(1): p. 13-6.
157. Louis-Sylvestre, J. and J. Le Magnen, *A fall in blood glucose level precedes meal onset in free-feeding rats*. *NBR Neuroscience and Biobehavioral Reviews: Supplement 1*, 1980. **4**: p. 13-15.
158. Biggers, D.W., et al., *Role of brain in counterregulation of insulin-induced hypoglycemia in dogs*. *Diabetes*, 1989. **38**(1): p. 7-16.
159. Nonogaki, K., *New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism*. *Diabetologia Diabetologia : Clinical and Experimental Diabetes and Metabolism*, 2000. **43**(5): p. 533-549.
160. Bensaid, A., et al., *Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats*. *PHB Physiology & Behavior*, 2002. **75**(4): p. 577-582.
161. Mellinkoff, S.M., et al., *Relationship between serum amino acid concentration and fluctuations in appetite*. *Journal of applied physiology*, 1956. **8**(5): p. 535-8.
162. Wang, S., et al., *Effects of "Bioactive" amino acids leucine, glutamate, arginine and tryptophan on feed intake and mRNA expression of relative neuropeptides in broiler chicks*. *J. Animal Sci. Biotechnol. Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2012. **3**(1).
163. Kennedy, G.C., *The regulation of food intake. Discussion*. *Advances in psychosomatic medicine*, 1972. **7**: p. 91-9.
164. Yaney, G.C. and B.E. Corkey, *Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells*. *Diabetologia Diabetologia : Clinical and Experimental Diabetes and Metabolism*, 2003. **46**(10): p. 1297-312.
165. Varga, T., Z. Czimmerer, and L. Nagy, *PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1812**(8): p. 1007-22.



166. Kremmyda, L.S., et al., *Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease*. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia, 2011. **155**(3): p. 195-218.
167. Suganuma, H., et al., *Maternal docosahexaenoic acid-enriched diet prevents neonatal brain injury*. NEUP Neuropathology, 2010. **30**(6): p. 597-605.
168. Bhatia, H.S., et al., *Omega-3 Fatty Acid Deficiency during Brain Maturation Reduces Neuronal and Behavioral Plasticity in Adulthood*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28451.
169. Bottiglieri, T., *Homocysteine and folate metabolism in depression*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2005. **29**(7): p. 1103-12.
170. Makrides, M., et al., *Effect of DHA supplementation during pregnancy on maternal depression and neurodevelopment of young children: a randomized controlled trial*. JAMA, 2010. **304**(15): p. 1675-83.
171. Murakami, K., et al., *Fish and n-3 polyunsaturated fatty acid intake and depressive symptoms: Ryukyus Child Health Study*. Pediatrics, 2010. **126**(3): p. e623-30.
172. Viveros, M., E. Marco, and S. File, *Endocannabinoid system and stress and anxiety responses*. Pharmacology Biochemistry and Behavior Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2005. **81**(2): p. 331-342.
173. Gould, D., & Petlichkoff, L. *Competitive sports for children and youth : an overview of research and issues*. in *Psychological stress and the age-group wrestlers*. 1988. Champaign, Ill.: Human Kinetics Books.
174. Bergeron, L.B. and P. Interamerican Congress of. *The development and validation of a french form of the state-trait anxiety inventory*. in *Cross-Cultural Anxiety*. 1976. Washington; New York: Hemisphere Pub. Co. ; Distributed by Halsted Press.
175. Kessler, R.C., et al., *The global burden of mental disorders: an update from the WHO World Mental Health (WMH) surveys*. Epidemiologia e psichiatria sociale, 2009. **18**(1).
176. Kessler, R.C., et al., *Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication*. Archives of general psychiatry, 2005. **62**(6): p. 593-602.
177. Sareen, J., et al., *Disability and poor quality of life associated with comorbid anxiety disorders and physical conditions*. Archives of internal medicine, 2006. **166**(19): p. 2109-16.
178. Stephens, T. and N. Joubert, *The economic burden of mental health problems in Canada*. Chronic diseases in Canada, 2001. **22**(1): p. 18-23.
179. Spielberger, C.D. and I.G. Sarason. *Stress and anxiety. Vol. 1*. 1975. Washington D.C.; New York: Hemisphere ; J. Wiley.
180. Sarason, I.G. and C.D. Spielberger, *Stress and anxiety. Vol. 2 Stress and Anxiety*. 1975, New York: J. Wiley.
181. Spielberger, C.D., R.L. Gorsuch, and R.E. Lushene, *STAI manual for the state-trait anxiety inventory ("Self-evaluation questionnaire")*. 1970, Palo Alto, Calif.: Consulting Psychologists Press.
182. Rowan, A.N., *Animal anxiety and animal suffering*. Applied Animal Behaviour Science Applied Animal Behaviour Science, 1988. **20**(1-2): p. 135-142.

183. Tison, L., *Utilisation des bêta-bloquants dans les troubles de l'anxiété chez les carnivores domestiques*, in *Thèse Méd. Vét.* 1987, Lyon.
184. Belzung, C. and G. Griebel, *Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review*. Behavioural Brain Research Behavioural Brain Research, 2001. **125**(1-2): p. 141-149.
185. Millan, M.J., *The neurobiology and control of anxious states*. Progress in Neurobiology Progress in Neurobiology, 2003. **70**(2): p. 83-244.
186. Perica, M.M. and I. Delas, *Essential fatty acids and psychiatric disorders*. Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition, 2011. **26**(4): p. 409-25.
187. Connor, W.E., *Importance of n-3 fatty acids in health and disease*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(1 Suppl): p. 171S-5S.
188. McNaughton, N. and J.A. Gray, *Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety*. Journal of Affective Disorders Journal of Affective Disorders, 2000. **61**(3): p. 161-176.
189. Bourin, M., et al., *Animal models of anxiety in mice*. FCP Fundamental & Clinical Pharmacology, 2007. **21**(6): p. 567-574.
190. Sartori, S.B., N. Singewald, and R. Landgraf, *The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety*. Future Neurol. Future Neurology, 2011. **6**(4): p. 531-571.
191. Pifferi, F., et al., *Long-chain n-3 PUFAs from fish oil enhance resting state brain glucose utilization and reduce anxiety in an adult nonhuman primate, the grey mouse lemur*. J Lipid Res, 2015. **56**(8): p. 1511-8.
192. Kleftharas, G., *La dépression : approche cognitive et comportementale*. 2004, Paris: L'Harmattan.
193. Klerman, G.L. and M.M. Weissman, *The changing epidemiology of depression*. Clinical chemistry, 1988. **34**(5): p. 807-12.
194. Willner, P. and D. Sanger, *BEHAVIOURAL SENSITIZATION*. Behavioural Pharmacology Behavioural Pharmacology, 1993. **4**(4).
195. Hammen, C., *Stress and depression*. Annual review of clinical psychology, 2005. **1**: p. 293-319.
196. Chrousos, G.P. and P.W. Gold, *The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis*. JAMA, 1992. **267**(9): p. 1244-52.
197. Porsolt, R.D., A. Bertin, and M. Jalfre, *Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1977. **229**(2): p. 327-36.
198. Bremner, J.D., et al., *Hippocampal volume reduction in major depression*. The American journal of psychiatry, 2000. **157**(1): p. 115-8.
199. Porsolt, R.D., A. Bertin, and M. Jalfre, *"Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine*. Eur J Pharmacol, 1978. **51**(3): p. 291-4.
200. Cryan, J.F., C. Mombereau, and A. Vassout, *The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2005. **29**(4-5): p. 571-625.
201. Kompagne, H., et al., *Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats*. Behavioural brain research, 2008. **193**(2): p. 311-4.

202. Renoir, T., T.Y. Pang, and L. Lanfumey, *Drug withdrawal-induced depression: serotonergic and plasticity changes in animal models*. Neuroscience and biobehavioral reviews, 2012. **36**(1): p. 696-726.
203. Kim, W., D.N. McMurray, and R.S. Chapkin, *n-3 polyunsaturated fatty acids--physiological relevance of dose*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2010. **82**(4-6): p. 155-8.
204. Moreno-Aliaga, M.J., S. Lorente-Cebrian, and J.A. Martinez, *Regulation of adipokine secretion by n-3 fatty acids*. Proc Nutr Soc, 2010. **69**(3): p. 324-32.
205. Ginter E. and V. Simko, *Polyunsaturated fatty acids n-3: new data on heart disease, cancer, immune resistance and mental depression*. Bratisl Lek Listy, 2010. **111**(12): p. 680-5.
206. Leung, B.M. and B.J. Kaplan, *Perinatal depression: prevalence, risks, and the nutrition link--a review of the literature*. J Am Diet Assoc, 2009. **109**(9): p. 1566-75.
207. Murakami, K. and S. Sasaki, *Dietary intake and depressive symptoms: a systematic review of observational studies*. Mol Nutr Food Res, 2009. **54**(4): p. 471-88.
208. Hibbeln, J.R., *Fish consumption and major depression*. Lancet, 1998. **351**(9110): p. 1213.
209. Weissman, M.M., et al., *Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder*. Jama, 1996. **276**(4): p. 293-299.
210. Chiu, C.C., S.Y. Huang, and K.P. Su, *Omega-3 polyunsaturated fatty acids for postpartum depression*. Am J Obstet Gynecol, 2004. **190**(2): p. 582-3; author reply 583.
211. Ferraz, A.C., et al., *Chronic omega-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol*. Behav Brain Res, 2011. **219**(1): p. 116-22.
212. Berthoud, H.R., *Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance*. Physiology & behavior, 2004. **81**(5): p. 781-93.
213. Allen, J.S., *The lives of the brain : human evolution and the organ of mind*. 2009, Cambridge, Mass.; London: Belknap Press of Harvard University Press.
214. Spinella, M., *Evolutionary mismatch, neural reward circuits, and pathological gambling*. The International journal of neuroscience, 2003. **113**(4): p. 503-12.
215. Volkow, N.D.W.R.A., *How can drug addiction help us understand obesity?* NATURE NEUROSCIENCE, 2005. **8**(5): p. 555-560.
216. de Castro, J.M. and N. Stroebele, *Food intake in the real world: implications for nutrition and aging*. Clinics in geriatric medicine, 2002. **18**(4): p. 685-97.
217. Finkelstein Ea, R.C.J.K.K.M., *Economic causes and consequences of obesity*. Annual review of public health, 2005. **26**: p. 239-57.
218. Swinburn, B.S.G.R.E., *Increased food energy supply is more than sufficient to explain the US epidemic of obesity*. American Journal of Clinical Nutrition American Journal of Clinical Nutrition, 2009. **90**(6): p. 1453-1456.
219. Barker, D.J. and C. Osmond, *Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales*. Lancet (London, England), 1986. **1**(8489): p. 1077-81.
220. Fowden, A.L., D.A. Giussani, and A.J. Forhead, *Endocrine and metabolic programming during intrauterine development*. Early Human Development Early Human Development, 2005. **81**(9): p. 723-734.

221. Patel, M.S. and M. Srinivasan, *Metabolic programming: causes and consequences*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(3): p. 1629-32.
222. Plagemann, A., *Perinatal programming and functional teratogenesis: Impact on body weight regulation and obesity*. Physiology & Behavior Physiology & Behavior, 2005. **86**(5): p. 661-668.
223. Lucas, A., *Programming by early nutrition in man*. Ciba Foundation symposium, 1991. **156**: p. 38-50.
224. Arner, P., *The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones*. Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 2003. **14**(3): p. 137-45.
225. Gallou-Kabani, C. and C. Junien, *Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic*. Diabetes, 2005. **54**(7): p. 1899-906.
226. Taylor, P.D. and L. Poston, *Developmental programming of obesity in mammals*. Experimental physiology, 2007. **92**(2): p. 287-98.
227. Neel, J.V., *Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"?* American journal of human genetics, 1962. **14**: p. 353-62.
228. Hales, C.N. and D.J. Barker, *Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis*. Diabetologia, 1992. **35**(7): p. 595-601.
229. Symonds, M.E., et al., *Nutritional programming of the metabolic syndrome*. Nat Rev Endocrinol Nature Reviews Endocrinology, 2009. **5**(11): p. 604-610.
230. Turner, N.C., G.J. *Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle*. 2014; Available from: <http://hdl.handle.net/10536/DRO/DU:30062065>.
231. Guesnet, P., et al., *Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI)*. Oléagineux, Corps gras, Lipides, 2005. **12**(5): p. 333-343.
232. Sinclair, A.J., *Long-chain polyunsaturated fatty acids in the mammalian brain*. The Proceedings of the Nutrition Society, 1975. **34**(3): p. 287-91.
233. Racine Ra, D.R.J., *Sources of the very-long-chain unsaturated omega-3 fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid*. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 2007. **10**(2): p. 123-8.
234. Salem N Jr, H.F.Y.A.M.K.J.W.K.H.Y., *Fatty acid and phospholipid species composition of rat tissues after a fish oil diet*. Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research, 1989. **19**: p. 618-22.
235. Lando, A.M. and Y. Zhang, *Awareness and knowledge of methylmercury in fish in the United States*. Environ Res, 2011. **111**(3): p. 442-50.
236. Simopoulos, A.P., *Evolutionary Aspects of Diet and Essential Fatty Acids*. WORLD REVIEW OF NUTRITION AND DIETETICS, 2001(88): p. 18-27.
237. Burdge, G., *Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications*. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 2004. **7**(2): p. 137-44.
238. Plourde, M. and S.C. Cunnane, *Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements*. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, 2007. **32**(4): p. 619-634.
239. Alessandri, J.-M., et al., *Estradiol Favors the Formation of Eicosapentaenoic Acid (20:5n-3) and n-3 Docosapentaenoic Acid (22:5n-3) from Alpha-Linolenic Acid (18:3n-3) in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells*. Lipids, 2008. **43**(1): p. 19-28.

240. Henriksen, C.H.K.L.M.A.A.K.R.A.G.M.S.R.M.A.N.B.B.R.K.S.L.I., *Improved Cognitive Development Among Preterm Infants Attributable to Early Supplementation of Human Milk With Docosahexaenoic Acid and Arachidonic Acid*. PEDIATRICS PEDIATRICS, 2008. **121**(6): p. 1137-1145.
241. Innis, S.M., *Essential fatty acid transfer and fetal development*. Placenta, 2005. **26**: p. 570-575.
242. Jordan, R.G., *Prenatal Omega-3 Fatty Acids: Review and Recommendations*. Journal of Midwifery & Women's Health Journal of Midwifery & Women's Health, 2010. **55**(6): p. 520-528.
243. Bremond-Gignac, D., et al., *Visual development in infants: physiological and pathological mechanisms*. Curr Opin Ophthalmol, 2011. **22 Suppl**: p. S1-8.
244. Uauy, R., et al., *Essential fatty acids in visual and brain development*. Lipids, 2001. **36**(9): p. 885-95.
245. Marszalek Jr, L.H.F., *Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you*. Annual review of cell and developmental biology, 2005. **21**: p. 633-57.
246. Harris, W.S., *n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies*. Am J Clin Nutr, 1997. **65**(5 Suppl): p. 1645S-1654S.
247. Laviaille, M., et al., *Involvement of omega-3 fatty acids in emotional responses and hyperactive symptoms*. J Nutr Biochem, 2010. **21**(10): p. 899-905.
248. Hwang, D., *Fatty acids and immune responses--a new perspective in searching for clues to mechanism*. Annu Rev Nutr, 2000. **20**: p. 431-56.
249. Makris, G.C., et al., *The pleiotropic effects of statins and omega-3 fatty acids against sepsis: a new perspective*. Expert Opin Investig Drugs, 2010. **19**(7): p. 809-14.
250. Akresh, I.R., *Dietary assimilation and health among hispanic immigrants to the United States*. J Health Soc Behav, 2007. **48**(4): p. 404-17.
251. Buckley, J.D. and P.R. Howe, *Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids*. Obes Rev, 2009. **10**(6): p. 648-59.
252. Kanoski, S.E. and T.L. Davidson, *Western diet consumption and cognitive impairment: Links to hippocampal dysfunction and obesity*. Physiology & Behavior, 2011. **103**(1): p. 59-68.
253. Cortina, M.S. and H.E. Bazan, *Docosahexaenoic acid, protectins and dry eye*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2010. **14**(2): p. 132-7.
254. Ebert, S., et al., *Docosahexaenoic acid attenuates microglial activation and delays early retinal degeneration*. J Neurochem, 2009. **110**(6): p. 1863-75.
255. Jacques, C., et al., *Long-term effects of prenatal omega-3 fatty acid intake on visual function in school-age children*. J Pediatr, 2010. **158**(1): p. 83-90, 90 e1.
256. Boucher, O., et al., *Neurophysiologic and neurobehavioral evidence of beneficial effects of prenatal omega-3 fatty acid intake on memory function at school age*. Am J Clin Nutr, 2011. **93**(5): p. 1025-37.
257. Brown, L.A., L.M. Riby, and J.L. Reay, *Supplementing cognitive aging: a selective review of the effects of ginkgo biloba and a number of everyday nutritional substances*. Exp Aging Res, 2010. **36**(1): p. 105-22.
258. Cederholm T. and J. Palmblad, *Are omega-3 fatty acids options for prevention and treatment of cognitive decline and dementia?* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2009. **13**(2): p. 150-5.

259. Itua, I. and E.K. Naderali, *Review: omega-3 and memory function: to eat or not to eat*. Am J Alzheimers Dis Other Demen, 2010. **25**(6): p. 479-82.
260. Mendez, M.A., et al., *Maternal fish and other seafood intakes during pregnancy and child neurodevelopment at age 4 years*. Public Health Nutr, 2009. **12**(10): p. 1702-10.
261. Santillan, M.E., et al., *Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to diets with different omega-6:omega-3 ratios in mice*. Nutrition, 2009. **26**(4): p. 423-31.
262. Willatts, P. and J.S. Forsyth, *The role of long-chain polyunsaturated fatty acids in infant cognitive development*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2000. **63**(1-2): p. 95-100.
263. Legrand, P., *Comment augmenter l'apport nutritionnel en acides gras n-3? Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 2004. **11**(1): p. 50-54.
264. Boyce, J., *Eicosanoid mediators of mast cells: receptors, regulation of synthesis, and pathobiologic implications*. 2005.
265. Serhan, C.N., et al., *Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers*. Lipids, 2004. **39**(11): p. 1125-32.
266. Authority., E.F.S. *EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion related to the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA)*. 2012; Available from: [http://orbit.dtu.dk/en/publications/efsa-panel-on-dietetic-products-nutrition-and-allergies-nda-scientific-opinion-related-to-the-tolerable-upper-intake-level-of-eicosapentaenoic-acid-epa-docosahexaenoic-acid-dha-and-docosapentaenoic-acid-dpa\(b1d1511b-b91a-4457-b3d6-520685e8e20b\).html](http://orbit.dtu.dk/en/publications/efsa-panel-on-dietetic-products-nutrition-and-allergies-nda-scientific-opinion-related-to-the-tolerable-upper-intake-level-of-eicosapentaenoic-acid-epa-docosahexaenoic-acid-dha-and-docosapentaenoic-acid-dpa(b1d1511b-b91a-4457-b3d6-520685e8e20b).html).
267. Flock, M.R.H.W.S.K.-E.P.M., *Long-chain omega-3 fatty acids: time to establish a dietary reference intake*. NURE Nutrition Reviews, 2013. **71**(10): p. 692-707.
268. Hasler, C.M., *Functional foods: benefits, concerns and challenges—a position paper from the American Council on Science and Health*. The Journal of nutrition, 2002. **132**(12): p. 3772-3781.
269. Bei, R., et al., *Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on cardiac myocyte protection*. Front Biosci, 2011. **16**: p. 1833-43.
270. Delgado-Lista, J., et al., *Olive oil and haemostasis: platelet function, thrombogenesis and fibrinolysis*. Curr Pharm Des, 2011. **17**(8): p. 778-85.
271. Endo, J. and M. Arita, *[Roles of lipid mediators in controlling vascular inflammation and the progression of atherosclerosis]*. Nihon Rinsho, 2011. **69**(1): p. 34-8.
272. Gillet, L., et al., *Beneficial effects of omega-3 long-chain fatty acids in breast cancer and cardiovascular diseases: voltage-gated sodium channels as a common feature?* Biochimie, 2010. **93**(1): p. 4-6.
273. Kwak, S.M., et al., *Efficacy of Omega-3 Fatty Acid Supplements (Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid) in the Secondary Prevention of Cardiovascular Disease: A Meta-analysis of Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Trials*. Arch Intern Med, 2012: p. [Epub ahead of print].
274. Rauch, B. and J. Senges, *The effects of supplementation with omega-3 polyunsaturated Fatty acids on cardiac rhythm: anti-arrhythmic, pro-arrhythmic, both or neither? It depends*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 57.

275. Stene, L.C., G. Joner, and G. Norwegian Childhood Diabetes Study, *Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study*. Am J Clin Nutr, 2003. **78**(6): p. 1128-34.
276. Coste, T.C., et al., *Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid-enriched phospholipids in experimental diabetic neuropathy*. Diabetes, 2003. **52**(10): p. 2578-85.
277. Todorcevic, M., et al., *N-3 HUFAs affect fat deposition, susceptibility to oxidative stress, and apoptosis in Atlantic salmon visceral adipose tissue*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2009. **152**(2): p. 135-43.
278. Yehuda, S., et al., *Fatty acid mixture counters stress changes in cortisol, cholesterol, and impair learning*. International journal of neuroscience, 2000. **101**(1-4): p. 73-87.
279. Sawazaki, S., et al., *The effect of docosahexaenoic acid on plasma catecholamine concentrations and glucose tolerance during long-lasting psychological stress: a double-blind placebo-controlled study*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 1999. **45**(5): p. 655-65.
280. Kiecolt-Glaser, J.K., et al., *Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: a randomized controlled trial*. Brain, behavior, and immunity, 2011. **25**(8): p. 1725-1734.
281. Silvers, K.M. and K.M. Scott, *Fish consumption and self-reported physical and mental health status*. Public health nutrition, 2002. **5**(03): p. 427-431.
282. Freund-Levi, Y., et al., *Effects of omega-3 fatty acids on inflammatory markers in cerebrospinal fluid and plasma in Alzheimer's disease: the OmegAD study*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2009. **27**(5): p. 481-90.
283. Lavigne, J.V., et al., *Prevalence rates and correlates of psychiatric disorders among preschool children*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 1996. **35**(2): p. 204-14.
284. Colter, A.L., C. Cutler, and K.A. Meckling, *Fatty acid status and behavioural symptoms of attention deficit hyperactivity disorder in adolescents: a case-control study*. Nutr J, 2008. **7**: p. 8.
285. Ness, A.R., et al., *Advice to eat fish and mood: a randomised controlled trial in men with angina*. Nutritional neuroscience, 2003. **6**(1): p. 63-65.
286. Buynitsky, T. and D.I. Mostofsky, *Restraint stress in biobehavioral research: recent developments*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2009. **33**(7): p. 1089-1098.
287. Barcelo-Coblijn, G. and E.J. Murphy, *Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels*. Progress in lipid research., 2009. **48**(6): p. 355-374.
288. Salari, P., et al., *A systematic review of the impact of n-3 fatty acids in bone health and osteoporosis*. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research, 2008. **14**(3): p. 37-44.
289. Maillard, V., et al., *N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France*. IJC International Journal of Cancer, 2002. **98**(1): p. 78-83.
290. Serini, S., E. Piccioni, and G. Calviello, *Dietary n-3 PUFA vascular targeting and the prevention of tumor growth and age-related macular degeneration*. Current medicinal chemistry, 2009. **16**(34): p. 4511-26.

291. Jicha, G.A. and W.R. Markesbery, *Omega-3 fatty acids: Potential role in the management of early Alzheimer's disease*. Clin. Interventions Aging Clinical Interventions in Aging, 2010. **5**(1): p. 45-61.
292. Moriguchi, T., et al., *Reversal of docosahexaenoic acid deficiency in the rat brain, retina, liver, and serum*. Journal of lipid research, 2001. **42**(3): p. 419-27.
293. Martinez, M., *The fundamentals and practice of docosahexaenoic acid therapy in peroxisomal disorders*. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2000. **3**(2): p. 101-108.
294. Arterburn, L.M., E.B. Hall, and H. Oken, *Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans*. The American journal of clinical nutrition, 2006. **83**(6): p. S1467-1476S.
295. Delplanque, B., et al., *A dairy fat matrix providing alpha-linolenic acid (ALA) is better than a vegetable fat mixture to increase brain DHA accretion in young rats*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2012: p. [Epub ahead of print].
296. Neuringer, M., et al., *Dietary omega-3 fatty acid deficiency and visual loss in infant rhesus monkeys*. J Clin Invest. Journal of Clinical Investigation, 1984. **73**(1): p. 272-276.
297. Björkhem I, M.S., *Brain cholesterol: long secret life behind a barrier*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2004. **24**(5): p. 806-15.
298. Alessandri Jm, G.P.V.S.A.P.D.I.L.B.A.S.P.-B.C.C.-P.G.L.M., *Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life*. Reproduction, nutrition, development, 2004. **44**(6).
299. Tinoco, J., *Dietary requirements and functions of alpha-linolenic acid in animals*. Progress in lipid research, 1982. **21**(1): p. 1-45.
300. Andersen, H.R., J.B. Nielsen, and P. Grandjean, *Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals*. Toxicology, 2000. **144**(1-3): p. 1-3.
301. Ouellet, M., et al., *Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood-brain barrier: An in situ cerebral perfusion study*. Neurochemistry International, 2009. **55**(7): p. 476-482.
302. Quiñones-Hinojosa, A. and H.H. Schmidek, *Schmidek & Sweet operative neurosurgical techniques : indications, methods, and results*. 2012, Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders.
303. Brightman, M.W., *Morphology of blood-brain interfaces*. Experimental Eye Research Experimental Eye Research, 1977. **25**: p. 1-25.
304. Hawkins, B.T. and T.P. Davis, *The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease*. Pharmacological reviews, 2005. **57**(2): p. 173-85.
305. Langlet, F., et al., *Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain*. The Journal of comparative neurology, 2013. **521**(15): p. 3389-405.
306. Gabathuler, R., *Blood-brain barrier transport of drugs for the treatment of brain diseases*. CNS & neurological disorders drug targets, 2009. **8**(3): p. 195-204.
307. Pardridge, W.M., *Brain drug development and brain drug targeting*. Pharmaceutical research, 2007. **24**(9): p. 1729-32.
308. Goldstein, G.W. and A.L. Betz, *The blood-brain barrier*. Sci Am, 1986. **255**(3): p. 74-83.



309. Edmond, J., *Essential Polyunsaturated Fatty Acids and the Barrier to the Brain The Components of a Model for Transport*. Journal of Molecular Neuroscience, 2001. **16**(2-3): p. 181-194.
310. Ma, D., et al., *Cellular localization of epidermal-type and brain-type fatty acid-binding proteins in adult hippocampus and their response to cerebral ischemia*. Hippocampus, 2010. **20**(7): p. 811-9.
311. Utsunomiya, A., et al., *Localization of mRNA for fatty acid transport protein in developing and mature brain of rats*. Brain research. Molecular brain research, 1997. **46**(1-2): p. 1-2.
312. Hamilton, J.A. and K. Brunaldi, *A Model for Fatty Acid Transport into the Brain*. JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE, 2007. **33**(1): p. 12-17.
313. Hamilton, J.A., et al., *Fatty acid transport*. Journal of molecular neuroscience, 2001. **16**(2-3): p. 99-108.
314. Hamilton, J. and K. Brunaldi, *A Model for Fatty Acid Transport into the Brain*. Journal of Molecular Neuroscience, 2007. **33**(1): p. 12-17.
315. Hamilton, J.A. and F. Kamp, *How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids?* Diabetes, 1999. **48**(12): p. 2255-2269.
316. Hamilton, J.A.B.K., *A Model for Fatty Acid Transport into the Brain*. JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE, 2007. **33**(1): p. 12-17.
317. Rapoport, S.I., *In vivo fatty acid incorporation into brain phospholipids in relation to plasma availability, signal transduction and membrane remodeling*. Journal of molecular neuroscience : MN, 2001. **16**(2-3): p. 243-262.
318. Pardridge, W.M., J.D. Connor, and I.L. Crawford, *Permeability changes in the blood-brain barrier: causes and consequences*. CRC critical reviews in toxicology, 1975. **3**(2): p. 159-99.
319. Hamilton, J.A., *Fatty acid transport: difficult or easy?* J Lipid Res, 1998. **39**(3): p. 467-81.
320. Smith, Q.R. and H. Nagura, *Fatty acid uptake and incorporation in brain: studies with the perfusion model*. J Mol Neurosci, 2001. **16**(2-3): p. 167-72; discussion 215-21.
321. Spector, R., *Fatty acid transport through the blood-brain barrier*. J Neurochem, 1988. **50**(2): p. 639-43.
322. Drew, P.A., E. Smith, and P.D. Thomas, *Fat distribution and changes in the blood brain barrier in a rat model of cerebral arterial fat embolism*. Journal of the Neurological Sciences Journal of the Neurological Sciences, 1998. **156**(2): p. 138-143.
323. Agrawal, R. and F. Gomez-Pinilla, *'Metabolic syndrome' in the brain: deficiency in omega-3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition*. The Journal of physiology, 2012. **590**: p. 2485-99.
324. Nguyen, L.N., et al., *Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid*. Nature Nature, 2014. **509**(7501): p. 503-506.
325. Reis, L.C. and J.R. Hibbeln, *Cultural symbolism of fish and the psychotropic properties of omega-3 fatty acids*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2006. **75**(4-5): p. 227-236.
326. Brenna, J.T., *Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2002. **5**(2): p. 127-32.

327. Plourde, M.C.S.C., *Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements.* Appl. Physiol. Nutr. Metab. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, 2007. **32**(4): p. 619-634.
328. Hsieh, A.B.J.W.V.S.-N.E.D.G.-Y.N.P., *The influence of long chain polyunsaturate supplementation on docosahexaenoic acid and arachidonic acid in baboon neonate central nervous system.* BMC Medicine, 2005. **3**(1): p. 1-12.
329. Umhau Jc, Z.W.C.R.E.R.S.I.P.A.D.J.H.N.B.A.K.M.K.E.G.M.S., *Imaging incorporation of circulating docosahexaenoic acid into the human brain using positron emission tomography.* Journal of lipid research, 2009. **50**(7): p. 1259-68.
330. Rapoport Si, R.E.B.M., *Docosahexaenoic acid (DHA) incorporation into the brain from plasma, as an in vivo biomarker of brain DHA metabolism and neurotransmission.* Prostaglandins & other lipid mediators, 2011. **96**(1-4): p. 1-4.
331. Chen, C.T., et al., *The low density lipoprotein receptor is not necessary for maintaining mouse brain polyunsaturated fatty acid concentrations.* Journal of lipid research, 2008. **49**(1): p. 147-52.
332. DeMar, J.C., Jr., et al., *Effect of dietary docosahexaenoic acid on biosynthesis of docosahexaenoic acid from alpha-linolenic acid in young rats.* Journal of lipid research, 2008. **49**(9): p. 1963-80.
333. Salem Jr, N., et al., *Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system.* Lipids, 2001. **36**(9): p. 945-959.
334. Chen, C.T., et al., *The low levels of eicosapentaenoic acid in rat brain phospholipids are maintained via multiple redundant mechanisms.* J. Lipid Res. Journal of Lipid Research, 2013. **54**(9): p. 2410-2422.
335. Carrié I, C.M.d.J.D.F.H.B.J.M., *Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation.* Journal of lipid research, 2000. **41**(3): p. 465-72.
336. Clandinin, M.T., J. Jumpson, and M. Suh, *Relationship between fatty acid accretion, membrane composition, and biologic functions.* J Pediatr, 1994. **125**(5 Pt 2): p. S25-32.
337. Innis, S.M., *Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development.* Advances in experimental medicine and biology, 2004. **554**: p. 27-43.
338. Despres C., et al., *Neuromotor functions in Inuit preschool children exposed to Pb, PCBs, and Hg.* Neurotoxicol Teratol, 2005(- 0892-0362 (Print)): p. 245-57.
339. Clandinin MT., et al., *Intrauterine fatty acid accretion in infant brain: implications for fatty acid.* - Early Hum Dev. 1980 Jun;4(2):131-8., 1980(- 0378-3782 (Print)): p. - 131-8.
340. R. M. Benolken, R.E.A.T.G.W., *Membrane Fatty Acids Associated with the Electrical Response in Visual Excitation.* science Science, 1973. **182**(4118): p. 1253-1254.
341. Martinez, M., *Abnormal profiles of polyunsaturated fatty acids in the brain, liver, kidney and retina of patients with peroxisomal disorders.* Brain research, 1992. **583**(1): p. 171-182.
342. Neuringer, M., et al., *Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(11): p. 4021-5.

343. Hashimoto, M., et al., *Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats*. J Neurochem, 2002. **81**(5): p. 1084-91.
344. Moriguchi, T., R.S. Greiner, and N. Salem, *Behavioral Deficits Associated with Dietary Induction of Decreased Brain Docosahexaenoic Acid Concentration*. Journal of Neurochemistry, 2000. **75**(6): p. 2563-2573.
345. Himwich, W.A., *Biochemical and Neurophysiological Development of the Brain in the Neonatal Period*. 1962a.
346. Himwich, W.A., *Neurochemistry of aging*. Postgraduate medicine, 1962b. **31**: p. 195-200.
347. Green P, Y.E., *Fatty acid composition of late embryonic and early postnatal rat brain*. Lipids, 1996. **31**(8): p. 859-65.
348. Wainwright, P.E., *Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms*. The Proceedings of the Nutrition Society, 2002. **61**(1): p. 61-9.
349. Agostoni, C., et al., *Docosahexaenoic acid status and developmental quotient of healthy term infants*. Lancet, 1995. **346**(8975): p. 638.
350. Agostoni, C., et al., *Neurodevelopmental quotient of healthy term infants at 4 months and feeding practice: the role of long-chain polyunsaturated fatty acids*. Pediatr Res, 1995. **38**(2): p. 262-6.
351. Forsyth, J.S., et al., *Do long-chain polyunsaturated fatty acids influence infant cognitive behaviour?* Biochem Soc Trans, 1998. **26**(2): p. 252-7.
352. Richardson, A.J. and P. Montgomery, *The Oxford-Durham study: a randomized, controlled trial of dietary supplementation with fatty acids in children with developmental coordination disorder*. Pediatrics, 2005. **115**(5): p. 1360-6.
353. Willatts, P., et al., *Influence of long-chain polyunsaturated fatty acids on infant cognitive function*. Lipids, 1998. **33**(10): p. 973-80.
354. Willatts, P., et al., *Effect of long-chain polyunsaturated fatty acids in infant formula on problem solving at 10 months of age*. Lancet, 1998. **352**(9129): p. 688-91.
355. Helland, I.B., et al., *Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age*. Pediatrics, 2003. **111**(1): p. e39-44.
356. Hoffman, D.R., et al., *Visual function in breast-fed term infants weaned to formula with or without long-chain polyunsaturates at 4 to 6 months: a randomized clinical trial*. J Pediatr, 2003. **142**(6): p. 669-77.
357. du Bois T. M, C. Deng, and X.F. Huang, *Membrane phospholipid composition, alterations in neurotransmitter systems and schizophrenia*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2005. **29**(6): p. 878-88.
358. Skosnik, P.D. and J.K. Yao, *From membrane phospholipid defects to altered neurotransmission: is arachidonic acid a nexus in the pathophysiology of schizophrenia?* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003. **69**(6): p. 367-84.
359. Bourre Jm, F.M.Y.A.D.O.P.M.P.G.D.G., *The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats*. The Journal of nutrition, 1989. **119**(12): p. 1880-92.

360. Chen S., *Highly pure phospholipids based brain docosahexaenoic acid transporters*. Recent Pat CNS Drug Discov, 2009. **5**(2): p. 135-46.
361. Malnoe, A., H. Milon, and C. Reme, *Effect of in vivo modulation of membrane docosahexaenoic acid levels on the dopamine-dependent adenylate cyclase activity in the rat retina*. J Neurochem, 1990. **55**(5): p. 1480-5.
362. Innis Sm, d.L.P.O.S., *Dietary fatty acid composition in pregnancy alters neurite membrane fatty acids and dopamine in newborn rat brain*. The Journal of nutrition, 2001. **131**(1): p. 118-22.
363. Chalon, S., *Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2006. **75**(4-5): p. 259-69.
364. Alsio, J., et al., *Dopamine D1 receptor gene expression decreases in the nucleus accumbens upon long-term exposure to palatable food and differs depending on diet-induced obesity phenotype in rats*. Neuroscience, 2010. **171**(3): p. 779-87.
365. Dohlman, H.G., et al., *Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors*. Annual review of biochemistry, 1991. **60**: p. 653-88.
366. Lefkowitz, R.J., et al., *b-Adrenergic receptors and rhodopsin: shedding new light on an old subject*. TIPS Trends in Pharmacological Sciences, 1986. **7**: p. 444-448.
367. Klabunde, T. and G. Hessler, *Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors*. Chembiochem : a European journal of chemical biology, 2002. **3**(10): p. 928-44.
368. Flower, D.R., *Modelling G-protein-coupled receptors for drug design*. Biochimica et biophysica acta, 1999. **1422**(3): p. 207-34.
369. Takeda, S., et al., *Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence*. FEBS letters, 2002. **520**(1-3): p. 1-3.
370. Baldwin, J.M., *The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors*. The EMBO journal, 1993. **12**(4): p. 1693-703.
371. Spiegel, A., *Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease*. Annual review of physiology, 1996. **58**(1): p. 143-170.
372. Bockaert, J. and J.-P. Pin, *Utiliser un récepteur couplé aux protéines G pour communiquer. Un succès évolutif*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie, 1998. **321**(7): p. 529-551.
373. De Lean, A., J.M. Stadel, and R.J. Lefkowitz, *A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor*. The Journal of biological chemistry, 1980. **255**(15): p. 7108-17.
374. Stephenson, R.P., *A modification of receptor theory*. British journal of pharmacology and chemotherapy, 1956. **11**(4): p. 379-93.
375. Böhm, S.K., E.F. Grady, and N.W. Bunnett, *Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors*. The Biochemical journal, 1997. **322**: p. 1-18.
376. Harden, T.K., *Agonist-induced desensitization of the beta-adrenergic receptor-linked adenylate cyclase*. Pharmacological reviews, 1983. **35**(1): p. 5-32.
377. Cabrera-Vera, T.M., et al., *Insights into G protein structure, function, and regulation*. Endocrine reviews, 2003. **24**(6): p. 765-81.

378. Hur, E.-M. and K.-T. Kim, *G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: Achieving rapidity and specificity*. *Cellular Signalling*, 2002. **14**(5): p. 397-405.
379. Briscoe, C.P., et al., *The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids*. *The Journal of biological chemistry*, 2003. **278**(13): p. 11303-11.
380. Schnell, S., M. Schaefer, and C. Schöfl, *Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from beta-cells through activation of GPR40*. *Molecular and cellular endocrinology*, 2007. **263**(1-2): p. 1-2.
381. Kebede, M., et al., *Glucose activates free fatty acid receptor 1 gene transcription via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent O-GlcNAcylation of pancreas-duodenum homeobox-1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012. **109**(7): p. 2376-81.
382. Honoré, J.C., et al., *Fatty acid receptor Gpr40 mediates neuromicrovascular degeneration induced by transarachidonic acids in rodents*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2013. **33**(5): p. 954-61.
383. Hirasawa, A., et al., *Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120*. *Nature medicine*, 2005. **11**(1): p. 90-4.
384. Hirasawa, A., et al., *Free fatty acid receptors and drug discovery*. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2008. **31**(10): p. 1847-51.
385. Tanaka, T., et al., *Cloning and characterization of the rat free fatty acid receptor GPR120: in vivo effect of the natural ligand on GLP-1 secretion and proliferation of pancreatic beta cells*. *Arch Pharmacol*, 2008. **377**(4-6): p. 515-22.
386. Luo, J., et al., *A potent class of GPR40 full agonists engages the enteroinsular axis to promote glucose control in rodents*. *PloS one*, 2012. **7**(10).
387. Näslund, E., et al., *Glucagon-like peptide 1 increases the period of postprandial satiety and slows gastric emptying in obese men*. *The American journal of clinical nutrition*, 1998. **68**(3): p. 525-30.
388. Parker, H.E., et al., *Nutrient-dependent secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide from primary murine K cells*. *Diabetologia*, 2009. **52**(2): p. 289-98.
389. Morgan, N.G. and S. Dhayal, *G-protein coupled receptors mediating long chain fatty acid signalling in the pancreatic beta-cell*. *Biochemical Pharmacology*, 2009. **78**(12): p. 1419-1427.
390. Miyauchi, S., et al., *Distribution and regulation of protein expression of the free fatty acid receptor GPR120*. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2009. **379**(4): p. 427-434.
391. Cartoni, C., et al., *Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2010. **30**(25): p. 8376-82.
392. Matsumura, S., et al., *Colocalization of GPR120 with phospholipase-Cbeta2 and alpha-gustducin in the taste bud cells in mice*. *Neuroscience letters*, 2009. **450**(2): p. 186-90.
393. Matsumura, S., et al., *GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing*. *Biomedical research (Tokyo, Japan)*, 2007. **28**(1): p. 49-55.

394. Miyauchi, S.H.A.I.T.L.N.I.C.S.K.H.T.T.G., *Distribution and regulation of protein expression of the free fatty acid receptor GPR120*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2009. **379**(4): p. 427-434.
395. Watson, S.J., A.J. Brown, and N.D. Holliday. *Differential Signaling by Splice Variants of the Human Free Fatty Acid Receptor GPR120*. 2012; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3336805/>.
396. Wellhauser, L. and D. Belsham, *Activation of the omega-3 fatty acid receptor GPR120 mediates anti-inflammatory actions in immortalized hypothalamic neurons*. J Neuroinflammation, 2014.
397. Nguyen, L.N., et al., *Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid*. Nature, 2014. **509**(7501): p. 503-6.
398. Kaku, K., T. Araki, and R. Yoshinaka, *Randomized, double-blind, dose-ranging study of TAK-875, a novel GPR40 agonist, in Japanese patients with inadequately controlled type 2 diabetes*. Diabetes care, 2013. **36**(2): p. 245-50.
399. Hsieh, A.T. and J.T. Brenna, *Dietary docosahexaenoic acid but not arachidonic acid influences central nervous system fatty acid status in baboon neonates*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2009. **81**(2-3): p. 105-10.
400. DeMar, J.C., Jr., et al., *Brain elongation of linoleic acid is a negligible source of the arachidonate in brain phospholipids of adult rats*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(9): p. 1050-9.
401. Orr, S.K., et al., *The fat-1 mouse has brain docosahexaenoic acid levels achievable through fish oil feeding*. Neurochem Res, 2010. **35**(5): p. 811-9.
402. Bourre Jm, D.O.D.G., *Brain phospholipids as dietary source of (n-3) polyunsaturated fatty acids for nervous tissue in the rat*. Journal of neurochemistry, 1993. **60**(6): p. 2018-28.
403. McNamara, R.K. and S.E. Carlson, *Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology*. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 2006. **75**(4-5).
404. Chalon, S., *Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission*. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 2006. **75**(4-5).
405. Lafourcade, M., et al., *Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions*. Nat Neurosci, 2011. **14**(3): p. 345-50.
406. Orr, S.K., M.O. Trepanier, and R.P. Bazinet, *n-3 Polyunsaturated fatty acids in animal models with neuroinflammation*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013. **88**(1): p. 97-103.
407. Carrié I, C.M.d.J.D.F.H.B.J.M., *Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice*. Journal of lipid research, 2000. **41**(3): p. 473-80.
408. Fedorova, I. and N. Salem, *Omega-3 fatty acids and rodent behavior*. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids, 2006. **75**(4): p. 271-289.
409. Frances, H.M.C.B.J.M., *Effects of Dietary Alpha-Linolenic Acid Deficiency on Neuromuscular and Cognitive Functions in Mice*. LIFE SCIENCES, 1995. **57**(21): p. 1935.
410. Orr, S.K. and R.P. Bazinet, *The emerging role of docosahexaenoic acid in neuroinflammation*. Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000), 2008. **9**(7): p. 735-43.

411. Orr, S.K., et al., *Unesterified docosahexaenoic acid is protective in neuroinflammation*. J Neurochem, 2013. **127**(3): p. 378-93.
412. Levant, B., M.K. Ozias, and S.E. Carlson, *Sex-specific effects of brain LC-PUFA composition on locomotor activity in rats*. Physiology & behavior, 2006. **89**(2): p. 196-204.
413. Reisbick, S., et al., *Home cage behavior of rhesus monkeys with long-term deficiency of omega-3 fatty acids*. Physiology & behavior, 1994. **55**(2): p. 231-239.
414. Simopoulos, A.P., *The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases*. Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.), 2008. **233**(6): p. 674-88.
415. Mathai, M.L., et al., *Does perinatal omega-3 polyunsaturated fatty acid deficiency increase appetite signaling?* Obesity research, 2004. **12**(11): p. 1886-94.
416. Oh, D.Y., et al., *A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice*. Nat. Med. Nature Medicine, 2014. **20**(8): p. 942-947.
417. Crawford, M.A., *The role of essential fatty acids in neural development: implications for perinatal nutrition*. The American journal of clinical nutrition, 1993. **57**(5).
418. Simopoulos, A.P., *The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids*. Biomedicine & Pharmacotherapy Biomedicine & Pharmacotherapy, 2002. **56**(8): p. 365-379.
419. Hussein, N., et al., *Artificial Rearing of Infant Mice Leads to n-3 Fatty Acid Deficiency in Cardiac, Neural and Peripheral Tissues*. Lipids, 2009. **44**(8): p. 685-702.
420. Morgan, K., S. Obici, and L. Rossetti, *Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutritionally regulated*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(30): p. 31139-48.
421. Naughton, S.S.M., Michael L.; Hryciw, Deanne H.; McAinch, Andrew J. *Fatty Acid Modulation of the Endocannabinoid System and the Effect on Food Intake and Metabolism*. 2013; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3677644>.
422. Toth, P.P., *GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects*. Yearbook of Endocrinology Yearbook of Endocrinology, 2011. **2011**: p. 54-57.
423. Shimpukade, B., et al., *Discovery of a potent and selective GPR120 agonist*. Journal of medicinal chemistry, 2012. **55**(9): p. 4511-5.
424. Nakamoto, K., et al., *Involvement of the long-chain fatty acid receptor GPR40 as a novel pain regulatory system*. Brain research, 2012. **1432**: p. 74-83.
425. Negoro, N., et al., *Discovery of TAK-875: a potent, selective, and orally bioavailable GPR40 agonist*. ACS medicinal chemistry letters, 2010. **1**(6): p. 290-294.
426. Nixon, J.P., et al., *Evaluation of a quantitative magnetic resonance imaging system for whole body composition analysis in rodents*. Obesity (Silver Spring), 2010. **18**(8): p. 1652-9.
427. Richardson, N.R. and D.C.S. Roberts, *Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: A method to evaluate reinforcing efficacy*. Journal of neuroscience methods., 1996. **66**(1): p. n.p.
428. McKerchar, T.L., T.J. Zarcone, and S.C. Fowler, *Differential acquisition of lever pressing in inbred and outbred mice: comparison of one-lever and two-lever*

- procedures and correlation with differences in locomotor activity.* J Exp Anal Behav, 2005. **84**(3): p. 339-56.
429. Zarcone, T.J., R. Chen, and S.C. Fowler, *Differential acquisition of food-reinforced disk pressing by CD-1, BALB/cJ and C57BL/6J mice.* Behav Brain Res, 2004. **152**(1): p. 1-9.
430. Yu, T., et al., *Cognitive and neural correlates of depression-like behaviour in socially defeated mice: an animal model of depression with cognitive dysfunction.* The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP), 2011. **14**(3): p. 303-17.
431. Zurn, J.B., et al., *A Real-Time Rodent Tracking System for Both Light and Dark Cycle Behavior Analysis.* 2005. **1**: p. 87-92.
432. Montgomery, K.C., *The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive.* APJCPP Journal of Comparative and Physiological Psychology, 1955. **48**(4): p. 254-260.
433. Handley, S.L. and S. Mithani, *Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour.* Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 1984. **327**(1): p. 1-5.
434. Pellow, S., et al., *Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.* Journal of Neuroscience Methods Journal of Neuroscience Methods, 1985. **14**(3): p. 149-167.
435. Ohl, F., *Testing for anxiety.* Clinical Neuroscience Research Clinical Neuroscience Research, 2003. **3**(4-5): p. 233-238.
436. Salum, C., A.C. Roque-da-Silva, and S. Morato, *Conflict as a determinant of rat behavior in three types of elevated plus-maze.* BEPROC Behavioural Processes, 2003. **63**(2): p. 87-93.
437. Andersen, I.L., et al., *Effects of diazepam on the behaviour of weaned pigs in three putative models of anxiety.* Applied Animal Behaviour Science Applied Animal Behaviour Science, 2000. **68**(2): p. 121-130.
438. Chaouloff, F., M. Durand, and P. Mormède, *Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests.* Behavioural Brain Research Behavioural Brain Research, 1997. **85**(1): p. 27-35.
439. Hogg, S., *A review of the validity and variability of the Elevated Plus-Maze as an animal model of anxiety.* Pharmacology Biochemistry and Behavior Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1996. **54**(1): p. 21-30.
440. Walf Aa, F.C.A., *The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents.* Nature protocols, 2007. **2**(2): p. 322-8.
441. Lugo, J.N., G.D. Smith, and A.J. Holley, *Trace fear conditioning in mice.* Journal of visualized experiments: JoVE, 2013(85).
442. Hall, C.S. and E.L. Ballachey, *A study of the rat's behavior in a field; a contribution to method in comparative psychology.* 1932, [Berkeley]: [Univ. of California Press].
443. Walsh, R.N. and R.A. Cummins, *The Open-Field Test: a critical review.* Psychological bulletin, 1976. **83**(3): p. 482-504.
444. Carola, V., et al., *Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice.* Behavioural brain research, 2002. **134**(1-2): p. 1-2.



445. Steru, L., et al., *The automated Tail Suspension Test: a computerized device which differentiates psychotropic drugs*. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry, 1987. **11**(6): p. 659-71.
446. Steru, L., et al., *The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice*. Psychopharmacology, 1985. **85**(3): p. 367-370.
447. de Leeuw van Weenen, J.E., et al., *Pharmacological modulation of dopamine receptor D2-mediated transmission alters the metabolic phenotype of diet induced obese and diet resistant C57Bl6 mice*. Exp Diabetes Res, 2011. **2011**: p. 928523.
448. Latour, M.G., et al., *GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo*. Diabetes, 2007. **56**(4): p. 1087-94.
449. Organization, W.H., *The World health report: 2002: Reducing the risks, promoting healthy life*. 2002.
450. Joffre, C., et al., *n-3 LCPUFA improves cognition: The young, the old and the sick*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA), 2014. **91**(1-2): p. 1-20.
451. Huyghe, C.L., *Acides gras poly-insaturés (omega 3, omega 6) et fonctionnement du système nerveux central*. 2010.
452. Velloso, L.A. and E.P. Araújo, *Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity*. Neuroimmunomodulation, 2008. **15**(3): p. 189-93.
453. Bonnefond, A., et al., *Contribution of the low-frequency, loss-of-function p.R270H mutation in FFAR4 (GPR120) to increased fasting plasma glucose levels*. Journal of medical genetics, 2015. **52**(9): p. 595-8.
454. Blondeau, N. and S.M. Schneider, *Les acides gras essentiels de la famille des oméga-3 et la santé de la mère et de l'enfant*. Nutrition clinique et métabolisme, 2006. **20**(2): p. 68-72.
455. Blondeau, N. and S.M. Schneider, *Les acides gras essentiels de la famille des omega-3 et la sante de la mere et de l'enfant*. Nutrition clinique et métabolisme, 2006. **20**(2): p. 68-72.
456. Herrera, E., *Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus*. European journal of clinical nutrition, 2000. **54**: p. 47-51.
457. Berghaus, T.M., H. Demmelmair, and B. Koletzko, *Fatty acid composition of lipid classes in maternal and cord plasma at birth*. Eur J Pediatr European Journal of Pediatrics, 1998. **157**(9): p. 763-768.
458. Bourre, J.-M., *Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements for brain. Part 2: macronutrients*. Journal of Nutrition Health and Aging, 2006. **10**(5): p. 386.
459. Wang, H., L.H. Storlien, and X.F. Huang, *Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression*. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 2002. **282**(6): p. 1352-9.
460. Obici, S., et al., *Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake*. Diabetes, 2002. **51**(2): p. 271-5.
461. Keim, N.L., J.S. Stern, and P.J. Havel, *Relation between circulating leptin concentrations and appetite during a prolonged, moderate energy deficit in women*. The American journal of clinical nutrition, 1998. **68**(4): p. 794-801.

462. Clegg, D.J., et al., *Reduced anorexic effects of insulin in obesity-prone rats fed a moderate-fat diet*. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, 2005. **288**(4): p. 981-6.
463. Brown, M.F., *Modulation of rhodopsin function by properties of the membrane bilayer*. Chemistry and Physics of Lipids Chemistry and Physics of Lipids, 1994. **73**(1-2): p. 159-180.
464. Davis, J.F., et al., *Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat*. Behavioral neuroscience, 2008. **122**(6): p. 1257-63.
465. Berthoud Hr, Z.H.S.A.C., *Food reward in the obese and after weight loss induced by calorie restriction and bariatric surgery*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2012. **1264**: p. 36-48.
466. Foot, M. and C. T.F. *Influence of dietary fat on the lipid composition of rat brain synaptosomal and microsomal membranes*. 1982; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1154012>.
467. Kuperstein, F., R. Eilam, and E. Yavin, *Altered expression of key dopaminergic regulatory proteins in the postnatal brain following perinatal n-3 fatty acid dietary deficiency*. Journal of Neurochemistry, 2008. **106**(2): p. 662-671.
468. Luquet, S. and C. Cruciani-Guglielmacci, *Le contrôle central de la balance énergétique*. CND Cahiers de Nutrition et de Dietetique, 2009. **44**(1): p. 17-25.
469. Finger, B.C., T.G. Dinan, and J.F. Cryan, *Diet-induced obesity blunts the behavioural effects of ghrelin: studies in a mouse-progressive ratio task*. Psychopharmacology, 2012. **220**(1): p. 173-181.
470. Morales, L., et al., *Shift of circadian feeding pattern by high-fat diets is coincident with reward deficits in obese mice*. PloS one, 2012. **7**(5).
471. Vanni-Mercier, G., et al., *The Hippocampus Codes the Uncertainty of Cue-Outcome Associations: An Intracranial Electrophysiological Study in Humans*. The journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience., 2009. **29**(16): p. 5287.
472. Luchtman, D.W. and C. Song, *Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from child-hood to old age: findings from animal and clinical studies*. Neuropharmacology, 2013. **64**: p. 550-565.
473. Larrieu, T., et al., *Nutritional n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency alters cannabinoid receptor signaling pathway in the brain and associated anxiety-like behavior in mice*. Journal of physiology and biochemistry, 2012. **68**(4): p. 671-81.
474. Moranis, A., et al., *Long term adequate n-3 polyunsaturated fatty acid diet protects from depressive-like behavior but not from working memory disruption and brain cytokine expression in aged mice*. Brain, behavior, and immunity, 2012. **26**(5): p. 721-731.
475. Davis-Bruno, K. and M.S. Tassinari, *Essential fatty acid supplementation of DHA and ARA and effects on neurodevelopment across animal species: a review of the literature*. BDRB Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 2011. **92**(3): p. 240-250.
476. Tvrzicka, E., et al., *Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part I: classification, dietary sources and biological*

- functions*. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia, 2011. **155**(2): p. 117-30.
477. Flax Council of, C. and C. Saskatchewan Flax Development, *Growing flax : production, management & diagnostic guide*. 2002, Winnipeg; Saskatoon: Flax Council of Canada ; Saskatchewan Flax Development Commission.
478. Goyal, A., et al., *Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food*. J Food Sci Technol Journal of Food Science and Technology, 2014. **51**(9): p. 1633-1653.
479. Ben Moumen, A., et al., *Biochemical characterisation of the seed oils of four safflower (<i>Carthamus tinctorius</i>) varieties grown in north-eastern of Morocco*. IJFS International Journal of Food Science & Technology, 2015. **50**(3): p. 804-810.
480. Gopala Krishna, A.G., et al., *Coconut Oil: Chemistry, Production and Its Applications - A Review*. INDIAN COCONUT JOURNAL -COCHIN-, 2010. **53**(3): p. 15-27.
481. Couet, C., et al., *Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults*. International Journal of Obesity, 1997. **21**(8): p. 637.
482. Hill, J.O., et al., *Lipid accumulation and body fat distribution is influenced by type of dietary fat fed to rats*. International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity, 1993. **17**(4): p. 223-36.
483. Duplus, E., M. Glorian, and C. Forest, *Fatty acid regulation of gene transcription*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(40): p. 30749-52.
484. Jump, D.B., *Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription*. Current opinion in lipidology, 2002. **13**(2): p. 155-64.
485. Ruzickova, J., et al., *Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue*. Lipids Lipids, 2004. **39**(12): p. 1177-1185.
486. Flachs, P., et al., *Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce b-oxidation in white fat*. Diabetologia Diabetologia : Clinical and Experimental Diabetes and Metabolism, 2005. **48**(11): p. 2365-2375.
487. Flachs, P., et al., *Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet*. Diabetologia Diabetologia : Clinical and Experimental Diabetes and Metabolism, 2006. **49**(2): p. 394-397.
488. DeLany, J.P., et al., *Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake*. The American journal of physiology, 1999. **276**(4): p. 1172-9.
489. Moya-Camarena, S.Y., et al., *Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPARalpha*. Journal of lipid research, 1999. **40**(8): p. 1426-33.
490. Baillie, R.A., et al., *Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition*. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 1999. **60**(5-6).
491. Nedergaard, J., T. Bengtsson, and B. Cannon, *Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans*. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism., 2007. **56**(2): p. E444.
492. Himms-Hagen, J., *Defective brown adipose tissue thermogenesis in obese mice*. International journal of obesity, 1985. **9**: p. 17-24.

493. Kim, H.K., et al., *Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes*. The Journal of nutrition, 2006. **136**(12): p. 2965-9.
494. Belzung, F., T. Raclot, and R. Groscolas, *Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets*. The American journal of physiology, 1993. **264**(6): p. 1111-8.
495. Corbett, S.W., J.S. Stern, and R.E. Keeseey, *Energy expenditure in rats with diet-induced obesity*. The American journal of clinical nutrition, 1986. **44**(2): p. 173-80.
496. Borkman, M., et al., *The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids*. The New England journal of medicine, 1993. **328**(4): p. 238-44.
497. Storlien, L.H., et al., *Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid*. Diabetes, 1991. **40**(2): p. 280-9.
498. Das, U., *Can perinatal supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids prevent diabetes mellitus?* European journal of clinical nutrition, 2003. **57**(2): p. 218-226.
499. Barker, D.J., *Fetal and infant origins of adult disease*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2001. **149**(1): p. S2-S6.
500. Blundell, J.E. and G. Finlayson, *Is susceptibility to weight gain characterized by homeostatic or hedonic risk factors for overconsumption?* Physiology & behavior, 2004. **82**(1): p. 21-25.
501. Gómez-Pinilla, F., *Brain foods: the effects of nutrients on brain function*. Nature reviews. Neuroscience, 2008. **9**(7): p. 568-78.
502. de la Presa Owens, S. and S.M. Innis, *Docosahexaenoic and arachidonic acid prevent a decrease in dopaminergic and serotonergic neurotransmitters in frontal cortex caused by a linoleic and alpha-linolenic acid deficient diet in formula-fed piglets*. The Journal of nutrition, 1999. **129**(11): p. 2088-93.
503. Ng, K.F. and S.M. Innis, *Behavioral responses are altered in piglets with decreased frontal cortex docosahexaenoic acid*. The Journal of nutrition, 2003. **133**(10): p. 3222-7.
504. Fontani, G., et al., *Blood profiles, body fat and mood state in healthy subjects on different diets supplemented with Omega-3 polyunsaturated fatty acids*. European journal of clinical investigation, 2005. **35**(8): p. 499-507.
505. Calder, P.C., *Polyunsaturated fatty acids and inflammation*. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 2006. **75**(3): p. 197-202.
506. Orr Sk, B.R.P., *The emerging role of docosahexaenoic acid in neuroinflammation*. Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000), 2008. **9**(7): p. 735-43.
507. De Souza, C.T., et al., *Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus*. Endocrinology, 2005. **146**(10): p. 4192-9.
508. Maes, M., et al., *Lowered 3 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and cholesteryl esters of depressed patients*. Psychiatry Research Psychiatry Research, 1999. **85**(3): p. 275-291.

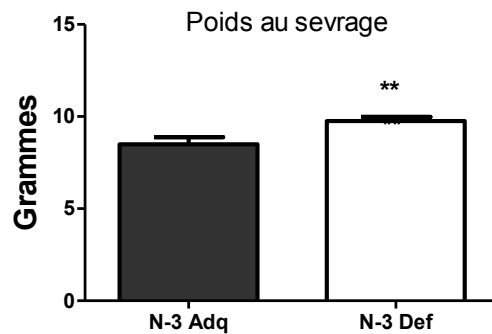
509. Tiemeier, H., et al., *Plasma fatty acid composition and depression are associated in the elderly: the Rotterdam Study*. The American journal of clinical nutrition, 2003. **78**(1): p. 40-6.
510. Peet, M., et al., *Depletion of Omega-3 Fatty Acid Levels in Red Blood Cell Membranes of Depressive Patients*. Biological Psychiatry Biological Psychiatry, 1998. **43**(5): p. 315-319.
511. Nemets, B., Z. Stahl, and R.H. Belmaker, *Addition of omega-3 fatty acid to maintenance medication treatment for recurrent unipolar depressive disorder*. The American journal of psychiatry, 2002. **159**(3): p. 477-9.
512. Peet, M. and D.F. Horrobin, *A dose-ranging study of the effects of ethyl-eicosapentaenoate in patients with ongoing depression despite apparently adequate treatment with standard drugs*. Archives of general psychiatry, 2002. **59**(10): p. 913-9.
513. Stoll, A.L., et al., *Omega 3 fatty acids in bipolar disorder: a preliminary double-blind, placebo-controlled trial*. Archives of general psychiatry, 1999. **56**(5): p. 407-412.
514. Austin, M.P., P. Mitchell, and G.M. Goodwin, *Cognitive deficits in depression: possible implications for functional neuropathology*. The British journal of psychiatry : the journal of mental science, 2001. **178**: p. 200-6.
515. Airaksinen, E., et al., *Cognitive functions in depressive disorders: evidence from a population-based study*. Psychological medicine, 2004. **34**(1): p. 83-91.
516. Mamalakis, G., M. Tornaritis, and A. Kafatos, *Depression and adipose essential polyunsaturated fatty acids*. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 2002. **67**(5): p. 311-8.
517. Fehily, A.M.A., et al., *Plasma and erythrocyte membrane long chain polyunsaturated fatty acids in endogenous depression*. Neurochemistry International Neurochemistry International, 1981. **3**(1): p. 37-42.
518. DeMar, J.C., Jr., et al., *One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats*. Journal of lipid research, 2006. **47**(1): p. 172-80.
519. Parker, G., et al., *Omega-3 Fatty Acids and Mood Disorders*. AMERICAN JOURNAL OF PSYCHIATRY, 2006. **163**(6): p. 969-978.
520. Lim, S., et al., *Artificial feeding of an n-3 essential fatty acid-deficient diet leads to a loss of brain function in the first generation*. Essential fatty acids and eicosanoids. AOCS Press, Champaign, 2003.
521. Weisinger, H.S., et al., *Retinal sensitivity loss in third-generation n-3 PUFA-deficient rats*. Lipids Lipids, 2002. **37**(8): p. 759-765.
522. Wainwright, P., et al., *Effects of dietary n-3 fatty acid deficiency on Morris water-maze performance and amphetamine-induced conditioned place preference in rats*. Nutr. Neurosci, 1998. **1**: p. 281-293.
523. Wainwright, P.E., et al., *Brain and behavioral effects of dietary n-3 deficiency in mice: a three generational study*. Developmental psychobiology, 1994. **27**(7): p. 467-87.
524. Ward, G., et al., *Artificial rearing of infant rats on milk formula deficient in n-3 essential fatty acids: A rapid method for the production of experimental n-3 deficiency*. Lipids Lipids, 1996. **31**(1): p. 71-77.
525. Plata-Salamán, C.R., *Hypothalamus and the control of feeding: fifteen decades of direct association*. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 1998. **14**(1): p. 67-70.

526. Mitchell, D.C., S.-L. Niu, and B.J. Litman, *Enhancement of G protein-coupled signaling by DHA phospholipids*. *Lipids*, 2003. **38**(4): p. 437-443.
527. Schwinkendorf, D.R., et al., *Effects of central administration of distinct fatty acids on hypothalamic neuropeptide expression and energy metabolism*. *International journal of obesity* (2005), 2011. **35**(3): p. 336-44.
528. Freedman, N.J. and R.J. Lefkowitz, *Desensitization of G protein-coupled receptors*. *Recent Prog Horm Res*, 1996. **51**: p. 319-51; discussion 352-3.
529. Day, J. and R. Carelli, *The Nucleus Accumbens and Pavlovian Reward Learning*. *The Neuroscientist*, 2007. **13**(2): p. 148-159.
530. Armani, A., et al., *Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity*. *JCB Journal of Cellular Biochemistry*, 2010. **110**(3): p. 564-572.
531. Walenta, E., et al., *A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice*. *Nature medicine*, 2014. **20**(8): p. 942-947.
532. Corbett, S.W., E.J. Wilterdink, and R.E. Keeseey, *Resting oxygen consumption in over- and underfed rats with lateral hypothalamic lesions*. *Physiology & behavior*, 1985. **35**(6): p. 971-977.
533. Lépine, J.P. and M. Briley, *The increasing burden of depression*. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 2011. **7**: p. 3-7.
534. Chen, H.-F. and H.-M. Su, *Fish oil supplementation of maternal rats on an n-3 fatty acid-deficient diet prevents depletion of maternal brain regional docosahexaenoic acid levels and has a postpartum anxiolytic effect*. *J. Nutr. Biochem.*, 2012. **23**(3): p. 299-305.
535. Grewal, S.S., et al., *Behavioural and pharmacological characterisation of the canopy stretched attend posture test as a model of anxiety in mice and rats*. *Psychopharmacology*, 1997. **133**(1): p. 29-38.
536. Horton, T.J., et al., *Fat and carbohydrate overfeeding in humans: different effects on energy storage*. *The American journal of clinical nutrition*, 1995. **62**(1): p. 19-29.
537. Blundell, J., et al., *The fat paradox: fat-induced satiety signals versus high fat overconsumption*. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, 1995. **19**(11): p. 832.
538. Calon, F. and G. Cole, *Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies*. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2007. **77**(5): p. 287-293.
539. Colangelo, L.A., et al., *Higher dietary intake of long-chain  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids is inversely associated with depressive symptoms in women*. *Nutrition*, 2009. **25**(10): p. 1011-1019.
540. Canetti, L., E. Bachar, and E.M. Berry, *Food and emotion*. *Behavioural processes*, 2002. **60**(2): p. 157-164.
541. Adam, T.C. and E.S. Epel, *Stress, eating and the reward system*. *Physiology & behavior*, 2007. **91**(4): p. 449-458.
542. Kessler, R.C. and P.S. Wang, *The Descriptive Epidemiology of Commonly Occurring Mental Disorders in the United States\**. *Annu. Rev. Public Health*, 2008. **29**: p. 115-129.

543. Garipey, G., D. Nitka, and N. Schmitz, *The association between obesity and anxiety disorders in the population: a systematic review and meta-analysis*. International journal of obesity, 2010. **34**(3): p. 407-419.
544. De Moor, M.H., et al., *Testing causality in the association between regular exercise and symptoms of anxiety and depression*. Archives of General Psychiatry, 2008. **65**(8): p. 897-905.
545. Veldhuizen, S. and P. Kurdyak, *The social epidemiology of affective and anxiety disorders in later life in Canada*. Canadian Journal of Psychiatry, 2008. **53**(2): p. 104.
546. Sareen, J., et al., *The relationship between anxiety disorders and physical disorders in the US National Comorbidity Survey*. Depression and anxiety, 2005. **21**(4): p. 193-202.
547. Sharma, S., M. Fernandes, and S. Fulton, *Adaptations in brain reward circuitry underlie palatable food cravings and anxiety induced by high-fat diet withdrawal*. International journal of obesity, 2013. **37**(9): p. 1183-1191.
548. Zemdegs, J., et al., *High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice*. British journal of pharmacology, 2015.
549. Décarie-Spain L, S.S., Hryhorczuk C, Issa Garcia V, Barker PA, Arbour N, Alquier T, Fulton S, *Depressive-like behaviour and reward deficit induced by high-fat feeding: Role for striatal neuroinflammation and NFkB*. Mol Psychiatry Molecular Psychiatry, 2016(In revision).
550. Samat, A., et al., *Rimonabant for the Treatment of Obesity*. recent patents cardiovasc drug discov Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery, 2008. **3**(3): p. 187-193.
551. Christensen, R., et al., *Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials*. Lancet (London, England), 2007. **370**(9600): p. 1706-13.
552. Wu, Q., et al., *Identification of G-protein-coupled receptor 120 as a tumor-promoting receptor that induces angiogenesis and migration in human colorectal carcinoma*. Oncogene, 2013. **32**(49): p. 5541-50.
553. Jump, D.B. and S.D. Clarke, *Regulation of gene expression by dietary fat*. Annual review of nutrition, 1999. **19**: p. 63-90.
554. Schrauwen, P., et al., *Skeletal muscle uncoupling protein 3 expression is a determinant of energy expenditure in Pima Indians*. Diabetes, 1999. **48**(1): p. 146-9.
555. Clarke, S.D., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors: a family of lipid-activated transcription factors*. The American journal of clinical nutrition, 1999. **70**(4): p. 566-71.
556. Desvergne, B. and W. Wahli, *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism*. Endocrine reviews, 1999. **20**(5): p. 649-88.
557. Talukdar, S., J.M. Olefsky, and O. Osborn, *Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases*. Trends in pharmacological sciences, 2011. **32**(9): p. 543-50.
558. Goshen, I., et al., *Dynamics of retrieval strategies for remote memories*. Cell, 2011. **147**(3): p. 678-89.
559. Pascual, O., et al., *Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(4): p. 197-205.
560. Farooqui, A.A., et al., *Metabolic syndrome as a risk factor for neurological disorders*. Cell. Mol. Life Sci. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012. **69**(5): p. 741-762.

561. Ross, B.M., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and anxiety disorders*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2009. **81**(5): p. 309-312.
562. McEwen, B.S., *Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain*. Physiological reviews, 2007. **87**(3): p. 873-904.
563. Torres, S.J. and C.A. Nowson, *Relationship between stress, eating behavior, and obesity*. Nutrition, 2007. **23**(11): p. 887-894.

## Annexe 1 : Poids des souris au sevrage



Mesure du poids au sevrage (PND21) de la progéniture  $\omega$ -3 adéquat (N=32) et  $\omega$ -3 déficitaire (N=24) placée sous diète régulière. \*\*p=0.0046



## Annexe 2 : Composition de la diète régulière de base Chow

Macronutriments	% Énergie totale	Acides Gras	% composition totale
Densité énergétique Kcal/g (KJ/g)	3.1 (13.0)	C16:0 Palmitique	0.7%
Calories des protéines	24%	C18:0 Stéarique	0.2%
Calories des lipides	18%	C18:1 $\omega$ 9 Oléique	1.2%
Calories des hydrates de carbone	58%	C18:2 $\omega$ 6 Linoléique	3.1%
		C18:3 $\omega$ 3 Linoléique	0.3%
		Total Gras Saturés	0.9%
		Total monoinsaturés	1.3%
		Total polyinsaturés	3.4%

Composition nutritive de la diète régulière

Teklad Global 18% Protein Rodent Diet / Rodent chow (Harlan Teklad 8604)

### Annexe 3 : Composition de la diète hypocalorique

High Fat Diet Formula Product #		D12328	
		gm %	Kcal %
Protein		16.8	16.4
Carbohydrate		74.3	73.1
Fat		4.8	10.5
	<b>Total</b>		100.0
	<b>Kcal/gm</b>	4.07	
Ingredient		gm	Kcal
Casein, 80 Mesh		228	912
DL-Methionine		2	0
Maltodextrin 10		170	680
Corn Starch		835	3340
Sucrose		0	0
Soybean oil		25	225
Coconut oil, Hydrogenated		40	360
Mineral Mix S10001		40	0
Sodium Bicarbonate		10.5	0
Potassium Citrate, 1 H <sub>2</sub> O		4	0
Vitamin Mix V10001		10	40
Choline Bitartrate		2	0
FD&C Red Dye #40		0.1	2
<b>Total</b>		<b>1366.6</b>	<b>5557</b>

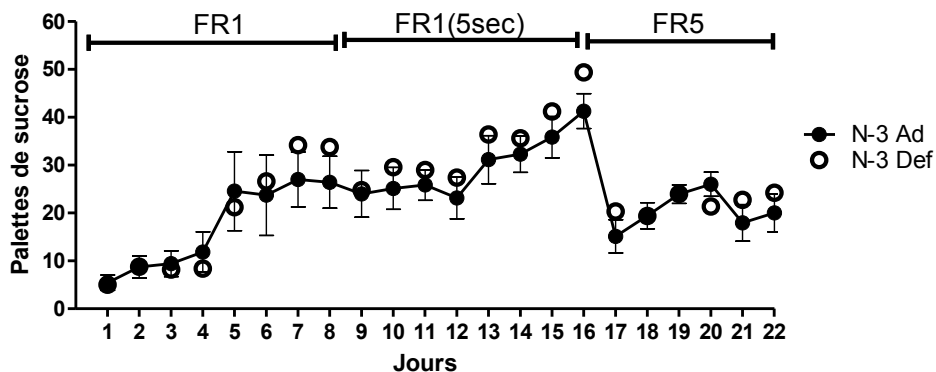
Différents ingrédients contenus dans la diète hypocalorique. 11 Kcal% gras sans sucre.

## Annexe 4 : Composition de la diète hypercalorique

High Fat Diet Formula Product #		D12331	
		gm %	Kcal %
Protein		23.0	16.4
Carbohydrate		35.5	25.5
Fat		35.8	58.0
	<b>Total</b>		100.0
	<b>Kcal/gm</b>	5.56	
Ingredient		gm	Kcal
Casein, 80 Mesh		228	912
DL-Methionine		2	0
Maltodextrin 10		170	680
Corn Starch		0	0
Sucrose		175	700
Soybean oil		25	225
Coconut oil, Hydrogenated		333.5	3001.5
Mineral Mix S10001		40	0
Sodium Bicarbonate		10.5	0
Potassium Citrate, 1 H <sub>2</sub> O		4	0
Vitamin Mix V10001		10	40
Choline Bitartrate		2	0
FD&C Red Dye #40		0.1	2
<b>Total</b>		<b>1000.1</b>	<b>5558.5</b>

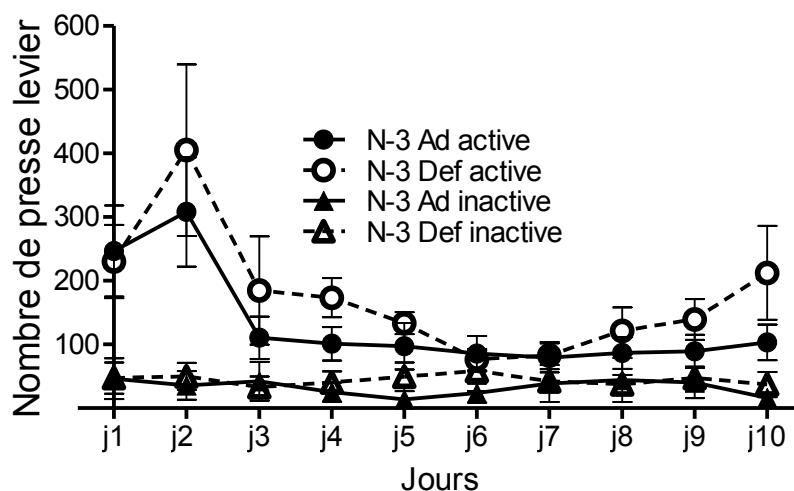
Différents ingrédients contenus dans la diète obésogène riche en gras et en sucre. 58 Kcal% gras avec sucrose.

## Annexe 5 : Mesure de l'apprentissage et de la mémoire



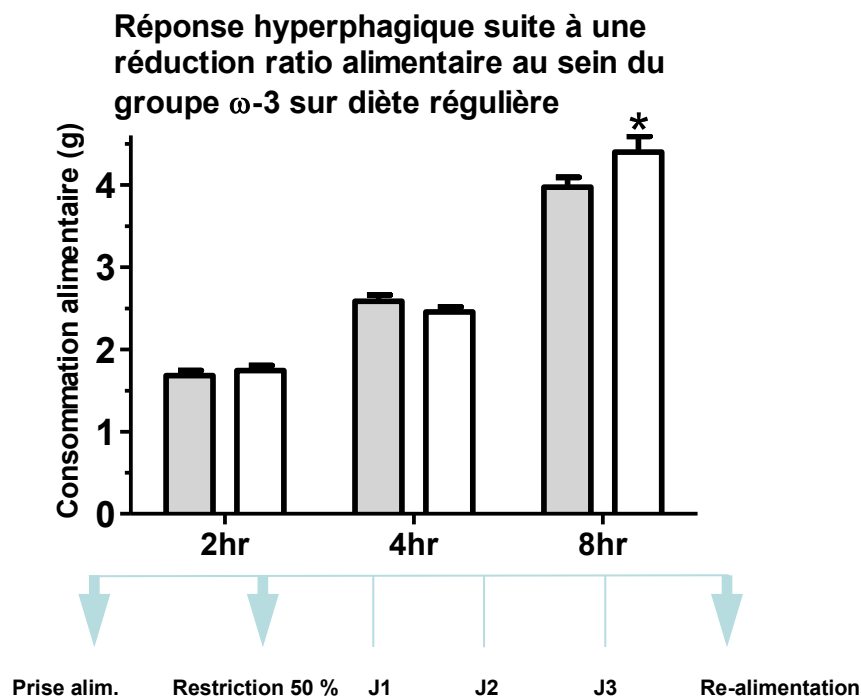
A- Test d'apprentissage à utiliser «l'operant chamber» pour obtenir une récompense

Les deux groupes N3 adéquate et déficient ont appris comment utiliser «l'operant chamber» de FR1, FR1 (5sec) et FR5 pour obtenir la récompense palatable



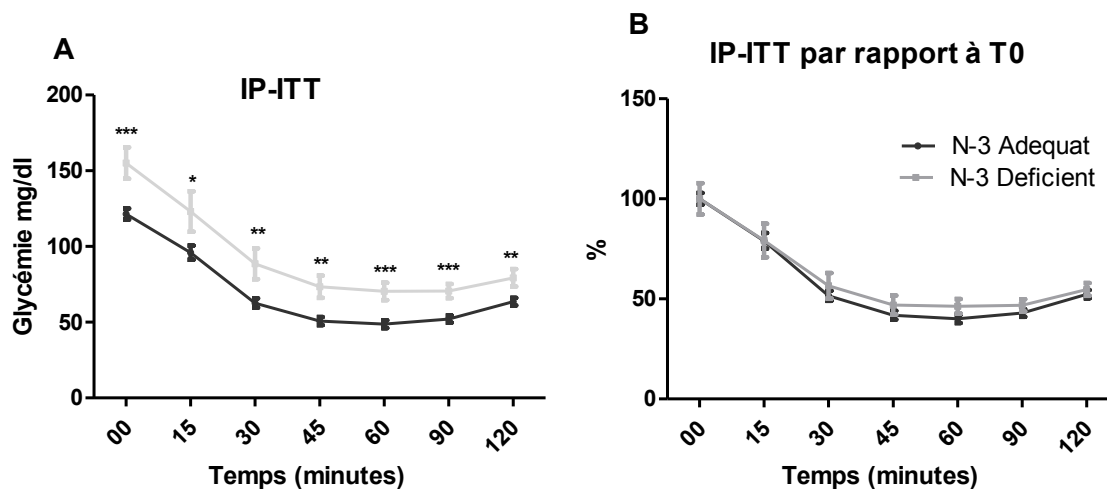
B- Représentation du nombre de levier actif vs inactif pressé par les souris  $\omega$ -3 adéquat et  $\omega$ -3 déficitaire durant la période d'apprentissage du ratio progressif. Pas de différence entre les 2 groupes lorsqu'on compare le nombre de levier actif pressé par rapport au nombre de levier inactif pressé, signifiant que les 2 groupes se rappellent lequel des leviers est actif et lequel est inactif.

## Annexe 6 : Réponse hyperphagique post restriction alimentaire



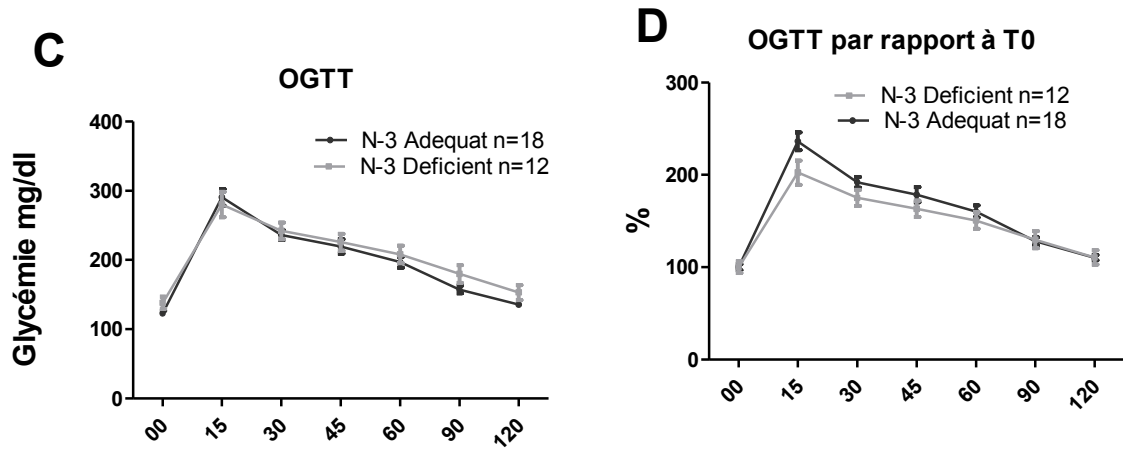
L'apport alimentaire de base a été mesuré pendant 3 jours avant la restriction alimentaire en réduisant le ratio de base à 50 % pendant 3 jours (J1, J2, J3). L'accès complet à l'alimentation a été rétabli, et la mesure de la prise alimentaire a été mesurée à différentes heures (h2, h4, h8). Au bout de 8 heures, le groupe déficitaire a mangé significativement plus que le groupe adéquat. \* $p=0.0478$

## Annexe 7 : Métabolisme glucidique



Test d'insulino-résistance provoquée par voie péritonéale chez la progéniture mâle

**A-** Niveau du glucose durant le test de tolérance à l'insuline à environ 21 semaines d'âge par injection intra péritonéale d'insuline régulière. **B-** Courbe de normalisation de la glycémie par rapport à la moyenne de toutes les souris à T0. Chez les souris  $\omega$ -3 adéquat (n=18) et  $\omega$ -3 déficitaire (n=13). Mean $\pm$ SEM; \*p<.05, \*\*p<.01, \*\*\*p<.001



Test d'hyperglycémie provoquée par voie orale chez la progéniture mâle.

**C-** Niveau du glucose durant le test de tolérance au glucose par voie orale à environ 23 semaines d'âge. **D-** Courbe de normalisation de la glycémie par rapport à la moyenne de toutes les souris à T0. Chez les souris  $\omega$ -3 adéquat (n=18) et  $\omega$ -3 déficitaire (n=12).

## Annexe 8 : Fiche technique pour tests OGTT et IP-ITT

Animal Info	0 min	Time start	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
Animal ID	Time		Time:	Time:	Time:	Time:	Time:	Time:
BW:	Glycemia		Glycemia:	Glycemia:	Glycemia:	Glycemia:	Glycemia:	Glycemia:
Dose:								

Animal Info	0 min	Time start	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
Animal ID	Time		Time:	Time:	Time:	Time:	Time:	Time:
BW:	Glycemia		Glycemia:	Glycemia:	Glycemia:	Glycemia:	Glycemia:	Glycemia:
Dose:								



## Annexe 9 : Fichier d'acceptation de protocole



COMITÉ INSTITUTIONNEL DE PROTECTION DES ANIMAUX

Téléphone : (514) 375-2323

Montréal, le 4 juin 2013

Dre [Redacted]  
Centre de recherche  
Division Angus, F3004  
Technopôle Angus du CHUM

Objet : An10038SFs - Role of omega-3 fatty acid dietary deficiency during the perinatal period on food motivation and dopamine tone in the offspring  
(Modification 1 au renouvellement 2)

Bonjour [Redacted],

Nous vous informons par la présente que votre demande de modification au protocole ci haut référencé a été soumise au sous-comité du CIPA et a été approuvée en date du 3 juin 2013 par le comité d'éthique. À cet effet, vous recevrez l'original signé de votre protocole par courrier après la prochaine rencontre du CIPA.

Nous vous rappelons qu'il est de votre responsabilité de transmettre les informations du protocole à tous les utilisateurs. Nous espérons que vous obtiendrez les résultats escomptés dans votre projet et vous prions de croire, [Redacted], en l'expression de nos salutations distinguées. En outre, le CIPA tient à vous rappeler que si vous employez des drogues contrôlées, la demande de permis doit être faite à chaque année auprès de Santé Canada.

Le président du CIPA

[Redacted Signature]