

Université de Montréal

Rôle du GPR120 microglial dans la neuro-inflammation et le comportement anxio-dépressif

Par Diane Bairamian

Département de nutrition

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences (M.Sc.) en nutrition

20 Mars, 2018

© Diane Bairamian, 2018

Ce mémoire intitulé:

Rôle du GPR120 microglial dans la neuro-inflammation et le comportement anxio-dépressif

Présenté par:

Diane Bairamian

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Mme May Faraj, PhD

Président-Rapporteur

Mme Stephanie Fulton, PhD

Directrice de recherche

Mme Guylaine Ferland, PhD

Membre du jury

Résumé

Le GPR120 est un récepteur périphérique et central présent dans l'organisme, connu pour son rôle anti-inflammatoire et bénéfique au niveau du métabolisme. Au niveau central, il est fortement exprimé dans la microglie, cellules cérébrales faisant office de cellules immunitaires avec les astrocytes. Il existe de plus en plus d'évidence du rôle protecteur du GPR120 microglial au niveau de la neuro-inflammation et de son potentiel à agir sur le comportement, en réduisant notamment les signes reliés à l'anxiété et à la dépression chez les rongeurs et les humains.

Dans le cadre de la présente étude, quatre groupes de souris ont chacun reçu différentes diètes *in vivo* dont une riche en acides gras oméga-3 (agoniste du GPR120) suite à une diète précédente riche en acides gras saturés pro-inflammatoires. Le comportement des souris a par la suite été analysé afin d'étudier l'effet de la supplémentation *in vivo* en oméga-3 sur l'anxiété et la dépression. D'autres paramètres ont également été mesurés à l'issue de la supplémentation, tels que la glycémie et le profil des lipides en circulation.

Dans un deuxième temps, l'activation du GPR120 a été testée *in vitro* afin d'étudier son rôle dans un contexte d'inflammation aiguë. Au niveau cellulaire, des cellules microgliales primaires prélevées de souris ont été exposées à divers agonistes du GPR120 (CpdA et oméga-3) en contexte d'inflammation aiguë (LPS), et l'impact sur le statut inflammatoire a été déterminé par la mesure de l'expression de plusieurs cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β et MCP-1) et de l'activation de la microglie.

Les résultats obtenus *in vivo* montrent que les acides gras oméga-3 agissent positivement au niveau du comportement puisqu'ils réduisent certains signes associés au comportement anxio-dépressif chez les souris. De plus, ces acides gras améliorent significativement la glycémie et le profil des lipides circulants, suite à une supplémentation de plusieurs semaines. Enfin, le récepteur GPR120 réduit la neuro-inflammation, le taux de cytokines pro-inflammatoires et l'activation de la microglie *in vitro*.

Mots-clefs: Acides gras oméga-3, GPR120, Neuro-inflammation, Comportement, Métabolisme.

Abstract

GPR120 is a peripheral and central receptor present in the body, known for its anti-inflammatory role and beneficial role on metabolism. At the central level, it is strongly expressed in microglia, brain cells that act as immune cells with astrocytes. There is increasing evidence of the protective role of microglial GPR120 in neuroinflammation and its potential to improve behavior, including reducing signs of anxiety and depression in rodents and human.

In the present study, four groups of mice each received different diets *in vivo* including one rich in omega-3 fatty acids (GPR120 agonist) following a previous diet rich in pro-inflammatory saturated fatty acids. The behavior of these mice was subsequently studied to evaluate the effect of the omega-3 supplementation *in vivo* on anxiety and depression. Other parameters were also measured after the supplementation, such as blood glucose and circulating lipid profile.

In a second experiment, the activation of the GPR120 was tested *in vitro* to study its role in a context of acute inflammation. Primary microglial cells from mouse brain were exposed to various agonists of GPR120 (CpdA and omega-3) in acute inflammation (LPS). The effect on inflammation was determined by the measurement of the expression of several inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β and MCP-1) and the activation of microglia.

The results obtained *in vivo* show that the supplementation in omega 3 fatty acids acts positively on the behavior and reduces the signs of anxiety and depression in mice. It also improves both the blood glucose and the profile of circulating lipids. On the other hand, the GPR120 receptor reduces the neuroinflammation, the level of pro-inflammatory cytokines and the activation of microglia *in vitro*.

Keywords: Omega-3 fatty acids, GPR120, Neuroinflammation, Behavior, Metabolism.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
1. Introduction.....	1
1.1 Métabolisme énergétique et obésité.	1
1.2 Relation entre l'obésité et les troubles de l'humeur.....	4
1.3 Effets des acides gras de type oméga-3.....	6
1.3.1 Amélioration de l'homéostasie glucidique.....	7
1.3.2 Réduction des signes d'anxiété et de dépression.....	9
1.3.3 Réduction de l'inflammation	15
1.3.3.1 La microglie.....	16
1.3.3.2 Réduction de la neuro-inflammation	17
1.4 Le GPR120	20
1.4.1 Propriétés métaboliques et anti-inflammatoires du GPR120.....	21
1.4.2 Distribution du GPR120.....	22
1.4.3 Signalisation du GPR120.....	25
1.5 Contribution au projet.....	25
2. Problématique, hypothèse, objectifs et questions de recherche.....	26
2.1 Effets des oméga-3 <i>in vivo</i>.....	26
2.1.1 Problématique.....	26
2.1.2 Hypothèse.....	26
2.1.3 Objectifs.....	26
2.1.4 Questions de recherche.....	26
2.1.5 Pertinence de l'étude.....	27
2.1.6 Méthodologie et déroulement de la recherche.....	27
2.1.6.1 Groupes de souris.....	27
2.1.6.2 Déroulement des tests de comportement.....	29

2.2 Stimulation du GPR120 microglial <i>in vitro</i>	32
2.2.1 Problématique.....	33
2.2.2 Hypothèse.....	33
2.2.3 Objectifs.....	33
2.2.4 Questions de recherche.....	33
2.2.5 Pertinence de l'étude.....	33
2.2.6 Méthodologie et déroulement de la recherche.....	34
2.2.6.1 Types de souris utilisées.....	34
2.2.6.2 Prélèvement des cellules microgliales à partir de cerveaux de souris.....	36
2.2.6.3 Exposition de la microglie à diverses conditions.....	38
2.2.6.4 Mesure du niveau des cytokines.....	39
2.2.6.5 Étude de la morphologie de la microglie.....	40
3. Résultats	41
3.1 Effets des acides gras oméga-3 <i>in vivo</i>	41
3.1.1 Impacts au niveau de l'apport alimentaire et du poids des souris.....	41
3.1.2 Impacts au niveau du métabolisme.....	43
3.1.2.1 Amélioration du glucose sanguin.....	43
3.1.2.2 Amélioration du profil lipidique	44
3.1.3 Impacts au niveau du comportement.....	47
3.1.3.1 EPM ou labyrinthe en croix surélevée.....	47
3.1.3.2 OFT ou test de champ ouvert.....	48
3.1.3.3 FST ou test de nage forcée.....	50
3.2 Stimulation du GPR120 microglial <i>in vitro</i>	52
3.2.1 Réduction du niveau de cytokines par le CpdA	52
3.2.2 Réduction de la forme active des cellules microgliales	56
4. Discussion	58
4.1 Interprétation des résultats <i>in vivo</i>	58
4.1.1 Glucose sanguin.....	58
4.1.2 Lipidomique.....	60
4.1.1 Anxiété et dépression.....	62
4.2 Interprétation des résultats <i>in vitro</i>	65

4.2.1 Neuro-inflammation.....	65
4.2.2 Activation de la microglie.....	67
4.3 Implication réelle du GPR120.....	69
4.4 Forces et limites de l'étude.....	70
5. Conclusion et pistes de recherche.....	74
Bibliographie.....	x

Liste des figures

Figure 1: Liens inflammatoires entre l'obésité et les troubles métaboliques.....	3
Figure 2: Liens entre obésité et dépression.....	5
Figure 3: Répartition du GPR120 dans l'organisme.....	22
Figure 4: Répartition cérébrale du GPR120.....	23
Figure 5: Répartition cellulaire du GPR120 au niveau du cerveau chez les souris et les humains.....	24
Figure 6: Groupes de souris et types de diètes reçues	28
Figure 7: Expression du GPR120 microglial chez les souris $CX_3CR1^{CreER/+};GPR120^{fl/fl}$	36
Figure 8: Apports alimentaires et énergétiques cumulatifs moyens (semaines 8 à 14)	41
Figure 9: Poids moyen des souris au cours de la diète.....	42
Figure 10: Efficacité énergétique moyenne des 4 groupes de souris.....	43
Figure 11: Glycémies à l'issue des 14 semaines de diète.....	44
Figure 12: Pourcentage des lipides sanguins à l'issue des 14 semaines de diète.	46
Figure 13: Résultats du test du labyrinthe en croix surélevée à l'issue des 14 semaines de diète.....	48
Figure 14: Résultats du test de champ ouvert à l'issue des 14 semaines de diète.....	50
Figure 15: Résultats du test de nage forcée à l'issue des 14 semaines de diète.....	52
Figure 16: Effet du CpdA sur l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires.....	54
Figure 17: Effet du CpdA sur l'expression protéique des cytokines pro-inflammatoires.....	55
Figure 18: Effet de la stimulation du GPR120 sur la morphologie de la microglie.....	57

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique.

Akt ou PKB: Protéine kinase B.

ALA: Acide α -linoléique [18:3(n-3)].

ANOVA: *Analysis of variance*.

ApoB: Apolipoprotéine B-100.

ARN: Acide ribonucléique.

ATB: Antibiotiques.

BAT: *Brown adipose tissue*.

BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*.

CD40: *Cluster of differentiation 40*.

CD86: *Cluster of differentiation 86*.

CD206: *Cluster of differentiation 206*.

CDRS: *Childhood Depression Rating Scale*.

CLAMS: *Comprehensive Lab Animal Monitoring System*.

COX-2: *Cyclooxygenase-2*.

CpdA: *Compound A*.

CRP: *C-reactive protein* (Protéine C-réactive).

Ctrl: *Control diet* (diète contrôle).

Ctrl + FO: *Control diet + fish oil* (diète contrôle supplémentée en oméga-3).

CX₃CR1^{CreER}: *Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1*.

DHA: Acide docosahexaénoïque [22:6(n-3)].

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium* (milieu de culture).

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*.

EPA: Acide éicosapentaénoïque [20:5(n-3)].

EPM: *Elevated-plus maze* (test du labyrinthe en croix surélevée).

EYFP: *Enhanced yellow fluorescent protein*.

Fabp3: *Fatty acid binding protein 3*.

FBS: *Fetal bovine serum* (sérum utilisé en culture cellulaire).

FFA4: *Free-fatty acid receptor-4*.

FGF21: *Fibroblast growth factor 21*.

FST: *Forced swim test* (test de nage forcée).

GIR: *Glucose infusion rate*.

GLP-1: *Glucagon-like peptide-1*.

GLUT4: *Glucose transporter type 4*.

GPR40: *G-protein coupled receptor 40*.

GPR119: *G-protein coupled receptor 119*.

GPR120: *G-protein coupled receptor 120*.

GPR120 KO: *G-protein coupled receptor 120 knockout*.

HFD: *High fat diet* (diète riche en gras).

HFD + FO: *High fat diet + fish oil* (diète riche en gras supplémentée en oméga-3).

HGP: *Hepatic glucose production*.

ICV: *Intracérébroventriculaire*.

IF γ : *Interféron gamma*.

IKK: *I κ B kinase*.

IL-1: *Interleukine-1*.

IL-1 β : *Interleukine-1 beta*.

IL-6: *Interleukine-6*.

IL-10: *Interleukine-10*.

IMC: *Indice de masse corporelle*.

iNOS: *Nitric oxide synthase*.

JNK: *c-Jun N-terminal kinases*.

KO: *Knockout*.

LPS: *Lipopolysaccharide*.

MCP-1: *Monocyte chemotactic protein 1*.

NF κ B: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*.

OFT: *Open field test* (test de champ ouvert).

p38 MAPK: *p38 mitogen-activated protein kinases*.

PBS: *Phosphate buffered saline*.

PGF2 α : *Prostaglandine F $_{2\alpha}$* .

PKC- θ : *Protéine kinase C-thêta*.

POMS: *Profiles of Mood States*.

PPAR: *Peroxisome proliferator-activated receptor*.

PPAR- γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*.

qPCR: *Quantitative polymerase chain reaction*.

ROS: *Reactive oxygen species* (dérivés réactifs de l'oxygène).

RT-PCR: *Real time polymerase chain reaction*.

SIRT1: Sirtuine 1.

TAB1: *TGF-beta activated kinase 1 (MAP3K7) binding protein 1*.

TAK1: *TGF-beta activated kinase 1*.

TGF- β : *Transforming growth factor beta*.

TLR-4: *Toll-like receptor 4*.

TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*.

UCP-1: *Uncoupling protein 1*.

VLDL: *Very low density lipoprotein*.

w-3 ou n-3: Acide gras oméga-3.

WT: *Wild-type* (cellules de type naturel ou sauvage).

1. Introduction

1.1 Métabolisme énergétique et obésité

Depuis les dernières décennies, on assiste à une augmentation croissante des problèmes de poids dans le monde, dû principalement à des changements rapides de mode de vie. Entre 1975 et 2014, l'IMC (indice de masse corporelle) moyen mondial est ainsi passé de 21.7 kg/m² à 24.2 kg/m² chez les hommes et de 22.1 kg/m² à 24.4 kg/m² chez les femmes [1]. Dans notre société hédoniste actuelle, les individus sont exposés en permanence à de la nourriture riche en gras et sucre (publicités, restaurants, grande disponibilité d'aliments savoureux à prix abordables etc.), ce qui les incite à une surconsommation. L'environnement alimentaire est « obésogène » et la distribution alimentaire a connu une transformation radicale depuis les 30 dernières années [2]. On assiste en effet à l'expansion/domination des chaînes de supermarchés, à l'afflux des restaurants-minute et à la multiplication des points de vente. Les changements d'habitudes alimentaires se traduisent principalement par une augmentation de la consommation d'aliments ultra-transformés au détriment des aliments frais ou minimalement transformés. La part d'énergie provenant des aliments ultra-transformés est ainsi passée de 24,4% en 1938 à 54,9% en 2001 au Canada [3].

L'accessibilité à la nourriture agréable au goût et l'omniprésence de la publicité alimentaire stimulent les gens à avoir faim et augmentent leur motivation à consommer. Face à cette abondance de nourriture, les signaux de faim et de satiété sont altérés et les besoins métaboliques dépassés [2]. Cela se traduit au niveau neural par une sécrétion augmentée de dopamine en réponse aux stimuli environnementaux [2]. La dopamine crée la sensation de désir et de motivation à répondre à ce désir conduisant à une surconsommation de nourriture.

En parallèle de l'augmentation des apports alimentaires, la dépense énergétique de l'homme moderne sédentaire est réduite, surtout depuis le milieu des années 1980 [2]. En effet, l'homme est devenu dépendant des nouvelles technologies comme l'ordinateur, la télévision ou encore les escaliers roulants qu'il consomme énormément au détriment de l'activité physique. Ces habitudes favorisent la sédentarité et peuvent mener à l'obésité. Le bilan énergétique est ainsi souvent positif avec des apports (prise alimentaire) qui surpassent les besoins et les dépenses énergétiques (métabolisme basal, thermogénèse et activité physique). La balance énergétique déséquilibrée peut expliquer, en partie, l'épidémie croissante d'excès pondéral et d'obésité.

L'obésité est un problème de santé publique qui touche près de 5 millions de canadiens en 2014, soit 20,2% de la population [4]. On parle d'obésité lorsque l'IMC est supérieur à 30 kg/m². Cet excès de masse grasse augmente les risques de maladies chroniques et de co-morbidités (hypertension, diabète de type 2, maladies cardiovasculaires etc.).

Les causes de l'obésité sont multiples et multifactorielles. Le développement de cette condition implique une interaction entre les gènes (ADN - acide désoxyribonucléique), la biologie (systèmes neuronaux, émotions etc.) et l'environnement (disponibilité et type de nourriture, exposition aux signaux, publicités etc.) [5]. La littérature démontre que les personnes obèses consomment davantage d'aliments que les personnes de poids normal dû entre autres à des différences au niveau de la réponse cérébrale. L'obésité induit en effet une réactivité sensorielle moindre à la stimulation orale que les personnes de poids normal, ainsi qu'une récompense moindre [6]. Le seuil de récompense étant plus élevé, les personnes obèses consomment davantage de nourriture savoureuse riche en gras et sucre pour satisfaire leurs envies. L'excès pondéral secondaire à cette surconsommation a un impact métabolique et homéostatique délétère et induit une importante inflammation centrale et périphérique [7] (Figure 1).

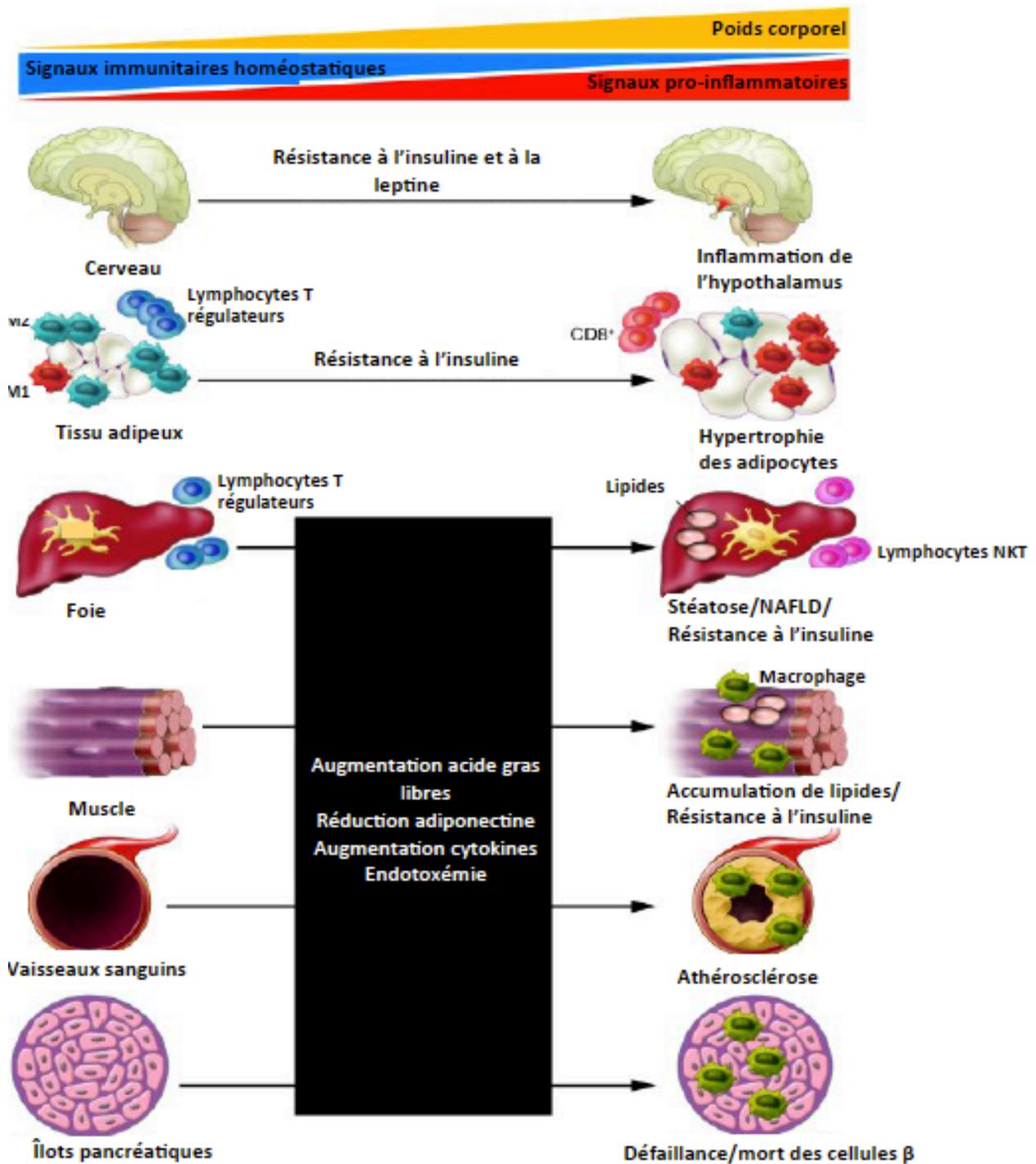


Figure 1. Liens inflammatoires entre l'obésité et les troubles métaboliques. Adapté de (Lumeng *et al.* 2011).
 Lymphocytes NKT: *Natural killer T*, M1: Macrophages M1, M2: Macrophages M2, NAFLD: Stéatose hépatique non alcoolique (*Non-alcoholic fatty liver disease*).

La surconsommation d'aliments riches en gras (saturés particulièrement) et sucre est associée à une inflammation de l'hypothalamus qui induit une augmentation de la prise alimentaire et du

stockage des nutriments [7]. Une diète riche en gras augmente l'expression hypothalamique d'IL-6 (interleukine-6), de TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) et de NF κ B [8].

Cet aspect est d'autant plus pertinent que l'hypothalamus est impliqué dans la balance énergétique et que l'inflammation de cette région cérébrale perturbe la régulation métabolique centrale [9]. Cette inflammation hypothalamique apparaît rapidement, 24h après le début d'une diète riche en gras saturés (représentative du profil de l'alimentation occidentale nord-américaine) [8] [10]. Elle est d'ailleurs l'une des premières manifestations décelables, avant même les changements significatifs du poids corporel [10]. Les mécanismes qui induisent l'inflammation centrale sont secondaires à la lipotoxicité induite par la diète riche en gras, soit à l'accumulation excessive des acides gras au niveau des cellules de l'organisme [11].

Cette dysfonction métabolique augmente les risques de complications et de co-morbidités (syndrome métabolique, diabète de type 2 etc.) [9]. L'inflammation centrale est plus prononcée chez les personnes obèses et leurs niveaux d'expression hypothalamique d'IL-6 et de TNF- α sont élevés [12]. Plus spécifiquement, l'inflammation centrale est plus prononcée chez les personnes ayant une obésité centrale (accumulation de graisse abdominale / viscérale et présence d'adipocytes dysfonctionnels) qu'une obésité périphérique (accumulation de graisse sous-cutanée) [13]. L'inflammation centrale perturbe les signaux cellulaires et affecte le fonctionnement des tissus périphériques [7]. L'inflammation de l'hypothalamus altère par exemple le fonctionnement des cellules β du pancréas et augmente les risques d'hypertension [7]. Les personnes obèses sont non seulement sujettes à une inflammation centrale mais également à une inflammation périphérique qui se traduit par des niveaux élevés de cytokines en périphérie telle que la CRP (*C-reactive protein*) [7].

En plus d'augmenter les risques de morbidités et de mortalité, l'obésité affecte le bien-être psychologique des personnes qui sont plus à risque de troubles de l'humeur [14].

1.2 Relation entre l'obésité et les troubles de l'humeur

L'obésité augmente considérablement les risques de développer des troubles de l'humeur, plus spécifiquement de dépression. Les patients obèses ont ainsi 55% plus de risque d'être atteints de dépression [15]. De plus, la dépression elle-même augmente les risques d'obésité de 58% [15]. Ces deux conditions qui sont inter-reliées nuisent non seulement au bien-être psychologique et à la qualité de vie des patients, mais également à l'adhérence aux traitements [15]. La dépression

est d'ailleurs davantage associée à l'obésité abdominale et à la présence de tissu adipeux viscéral [16]. Parmi les mécanismes sous-jacents à ces conditions on peut citer les perturbations de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ou encore l'inflammation qui sont induits autant par l'obésité que par la dépression elle-même [14]. Les patients obèses et dépressifs ont par exemple des niveaux de glucocorticoïdes et de cytokines inflammatoires plus élevés que des patients non-dépressifs (TNF- α , IL-6, NF κ B [17]), ainsi qu'une hyperinsulinémie et une importante résistance à l'insuline et à la leptine [14] (Figure 2).

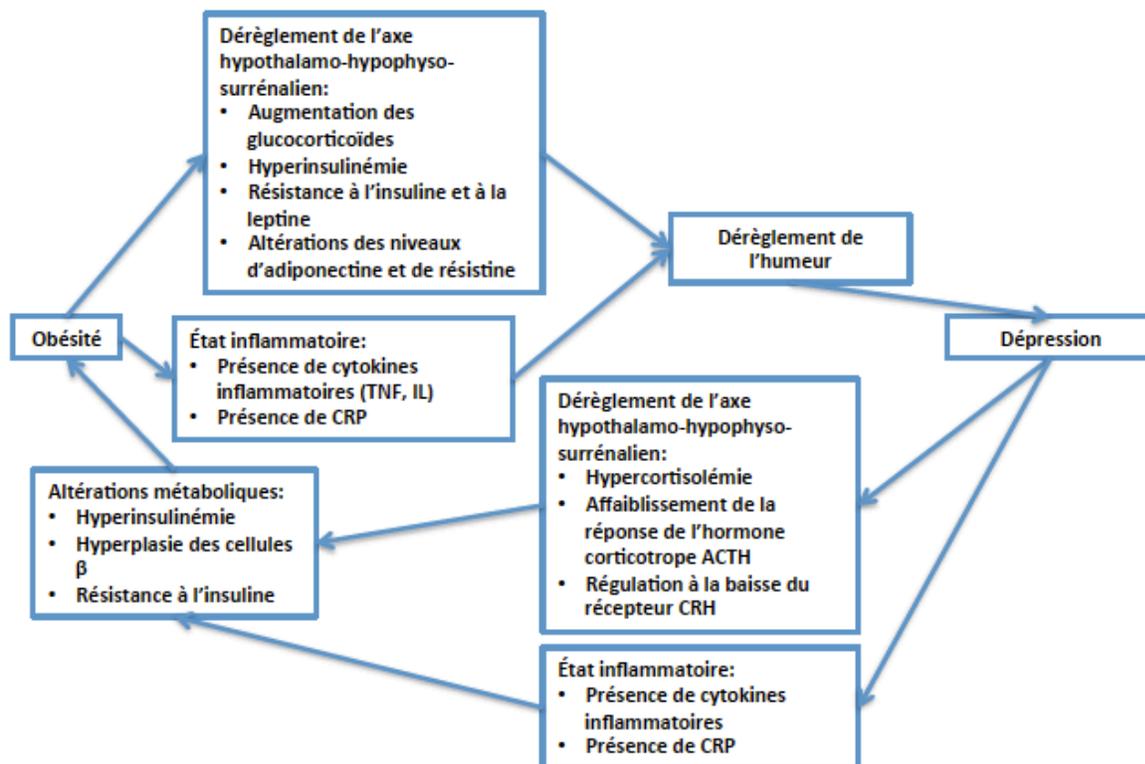


Figure 2. Liens entre obésité et dépression. Adapté de (Jantaratnotai *et al.* 2017).

ACTH: Hormone corticotrope (*Adrenocorticotropic hormone*), CRH: Corticolibérine (*Corticotropin-releasing hormone*), CRP: Protéine C-réactive (*C-reactive protein*), IL: Interleukine, TNF: Facteur de nécrose tumorale (*Tumor necrosis factor*).

Le cycle des troubles de l'humeur et de la dépression peut être déclenché par l'alimentation, plus spécifiquement par le type d'acides gras ingéré. La qualité des acides gras est centrale dans l'apparition ou non des comportements anxio-dépressifs chez les souris. Un apport prolongé en acides gras saturés entraîne ainsi non seulement des perturbations métaboliques (hyperinsulinémie, intolérance au glucose, inflammations centrale et périphérique), mais également des comportements anxio-dépressifs chez les souris [18] [19]. Cette modification de

comportement est associée à une inflammation du noyau accumbens au niveau central, une région du cerveau qui joue un rôle important dans la récompense et la motivation alimentaire [18]. La diète riche en gras saturés induit des mécanismes neuro-adaptatifs au niveau des circuits de récompense [19]. On observe en effet une augmentation de l'expression du BDNF (*brain-derived neurotrophic factor* - facteur neurotrophique impliqué dans la plasticité synaptique et la réduction de la dépression) au niveau du nucleus accumbens et du striatum dorsal, ainsi qu'une augmentation de l'activité du CREB au niveau du striatum dorsal [19].

L'apport en gras saturés augmente également la motivation pour la nourriture savoureuse riche en sucre chez les souris, l'apport alimentaire et les risques d'obésité [18]. L'augmentation de la prise alimentaire affecte la balance énergétique avec des apports qui surpassent les besoins métaboliques, conduisant à une prise pondérale et à de l'obésité éventuellement.

L'apport prolongé en gras favorise un apport compulsif en aliments riches en gras et sucres chez les personnes et les souris obèses [20]. Cette surconsommation d'aliments agréables au goût permet de soulager l'état émotionnel négatif qui découle de la dépression [20]. Elle renforce également les perturbations métaboliques/homéostasiques et les complications associées à un apport calorique élevé. L'obésité, la dépression et la surconsommation d'aliments sont donc inter-reliées et font partie d'un « cercle vicieux ». Ces conditions co-existent fréquemment et sont des facteurs de risque cardiovasculaires importants [21].

La relation bidirectionnelle entre l'obésité et la dépression doit être bien comprise afin d'assurer un traitement efficace pour les patients. Le traitement de ces conditions ne doit ainsi pas être compartimenté et il devrait cibler leurs mécanismes communs. Étant donné la présence commune d'inflammation dans le cadre de l'obésité et de la dépression, il est nécessaire de développer des thérapies anti-inflammatoires pour traiter ces conditions qui sont inter-reliées.

1.3 Effets des acides gras de type oméga-3

Les acides gras de type oméga-3 sont des acides gras polyinsaturés essentiels qui doivent provenir de l'alimentation puisque l'organisme ne peut pas les synthétiser. On retrouve ces acides gras dans certains aliments du monde animal (saumon, sardine, hareng) et végétal (lin, noix, chia). Les principales formes d'oméga-3 que l'on retrouve dans l'alimentation sont les suivantes: l'ALA (acide α -linoléique [18:3(n-3)]), l'EPA (acide éicosapentaénoïque [20:5(n-3)]) et le DHA (acide docosahexaénoïque [22:6(n-3)]). L'ALA est converti en EPA et en DHA dans l'organisme

grâce à l'action des désaturases et des élongases. Cependant, plusieurs données montrent que la conversion de l'ALA n'est pas optimale et que les bénéfices de cet acide gras sur la santé sont moindres que ceux de l'EPA et du DHA [22]. Les oméga-3 ont de nombreuses propriétés bénéfiques pour la santé et agissent à différents niveaux dans l'organisme (réduction des triglycérides sanguins et de l'ApoB [Apolipoprotéine B-100], potentiel anti-inflammatoire, amélioration de la résistance à l'insuline etc.) [23].

1.3.1 Amélioration de l'homéostasie glucidique

Les oméga-3 peuvent avoir un effet bénéfique sur la glycémie en augmentant la sensibilité à l'insuline et en réduisant la résistance périphérique à cette hormone. Cela s'explique par un effet de ces acides gras au niveau de la signalisation cellulaire, des facteurs de transcription et de l'expression de certains gènes.

Les oméga-3 augmentent ainsi la sensibilité à l'insuline chez les souris [24] [25] [26] en activant le récepteur GPR120 (*G-protein coupled receptor 120*) anti-inflammatoire qui est présent dans divers tissus [26]. Les oméga-3 ont également divers impacts sur les taux d'hormones circulants et augmentent l'adiponectine chez les humains [27] [28] et les animaux [28], qui est corrélé à la sensibilité à l'insuline [29]. C'est l'activation du PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) par les oméga-3 qui induit une augmentation de l'adiponectine et de la sensibilité à l'insuline [30]. Il existe en effet une corrélation entre le « statut » en oméga-3 (concentration des globules rouges en EPA et DHA) et la sensibilité à l'insuline, estimée à 0,23 [31]. Les études réalisées chez les souris montrent d'ailleurs qu'une diète enrichie en oméga-3 augmente la sensibilité à l'insuline des souris. Une supplémentation en DHA de 1% et 2% durant 20 semaines chez les souris réduit par exemple la glycémie lorsque comparée à celle de souris sur diète contrôle non enrichie ($p < 0,05$, -25% et -30% de réduction respectivement vs groupe Ctrl) [32].

Le DHA réduit également la résistance à l'insuline au niveau des muscles suite une exposition prolongée au palmitate, un acide gras saturé pro-inflammatoire [32]. De plus, il ramène au seuil normal le niveau de sensibilité à l'insuline des cellules musculaires en condition d'inflammation aiguë, ce qui tend à indiquer un effet réversible potentiel des oméga-3 sur la glycémie [32]. L'effet du DHA serait dû à une augmentation de la phosphorylation de l'Akt (ou PKB-Protéine kinase B) [32] qui permet la transduction du signal au niveau cellulaire et l'entrée du glucose

dans les myocytes. En effet, lorsque les récepteurs à insuline sont activés, il s'en suit une cascade de réactions qui conduisent à la prise de glucose par les muscles. Parmi ces étapes, on retrouve l'activation de la PI3-kinase, une molécule de signalisation qui active et phosphoryle l'Akt [33]. Cette activation induit la translocation des récepteurs GLUT4 (*glucose transporter type 4*) à la surface des cellules musculaires, permettant ainsi l'entrée du glucose dans les cellules, une meilleure sensibilité à l'insuline ainsi qu'une glycémie moins élevée. L'augmentation de la phosphorylation de l'Akt par le DHA n'est toutefois observable qu'en condition d'inflammation aiguë, donc de lipotoxicité, suite à une exposition aux acides gras saturés inflammatoires [32]. D'autre part, le DHA réduit l'accumulation de céramide au niveau des cellules musculaires et réduit l'activation du PKC- θ (protéine kinase C-thêta) [32]. Étant donné que les céramides et la PKC- θ sont associées à la résistance à l'insuline, le DHA améliore la sensibilité des myocytes à l'insuline et l'homéostasie glucidique. Il en est de même au niveau hépatique où le taux de perfusion de glucose (GIR - *glucose infusion rate*) est augmenté à l'issue d'une supplémentation en DHA [26].

Les oméga-3 augmentent également la sécrétion de l'insuline par la voie des incrétines. Ces acides gras stimulent ainsi le récepteur GPR120 présent au niveau de l'intestin ce qui augmente le GLP-1 (*Glucagon-like peptide-1*) [34] [35] [36], une incrétine sécrétée par les cellules L de l'intestin grêle. Cette incrétine potentialise l'effet de l'insuline et en augmente la sécrétion ce qui permet de mieux réguler la glycémie.

Les oméga-3 agissent aussi au niveau des récepteurs GPR120 présents au niveau du pancréas qui sont essentiels au maintien de l'équilibre glycémique. En l'absence de ce récepteur chez les souris (modèle GPR120 KO - *G-protein coupled receptor 120 knockout*), la glycémie est en effet mal contrôlée; la production hépatique de glucose, la sécrétion de glucagon par les cellules α du pancréas et la sensibilité hépatique au glucagon sont augmentées [37]. Ces données suggèrent que les oméga-3 stimulent le GPR120 du pancréas, empêchent la sécrétion excessive de glucagon et permettent une meilleure régulation de la glycémie. L'implication du GPR120 dans l'amélioration de la glycémie par les oméga-3 est confirmée par plusieurs études. Les effets métaboliques d'une diète riche en oméga-3 sont similaires à ceux d'une diète riche en CpdA (Compound A - agoniste du GPR120) chez les souris [25]. Les oméga-3 et la stimulation spécifique du GPR120 par le CpdA augmentent ainsi la tolérance au glucose et à l'insuline et réduisent la sécrétion d'insuline [25] [26]. Ceci renforce l'idée que l'effet des oméga-3 passe par

le GPR120 dont la présence est indispensable pour médier les effets bénéfiques des oméga-3 *in vivo* sur la glycémie.

D'autre part, les oméga-3 peuvent réduire l'inflammation au niveau des adipocytes en diminuant la forme pro-inflammatoire M1 des macrophages et augmenter la forme anti-inflammatoire M2 de ceux-ci [26]. Puisque l'inflammation adipocytaire est associée à une résistance à l'insuline plus élevée, les oméga-3 améliorent l'homéostasie glucidique. La réduction de l'inflammation du tissu adipeux par les oméga-3 passe par le GPR120 dont la présence est indispensable pour médier leurs effets. Ainsi, l'effet anti-inflammatoire des oméga-3 est observé uniquement chez les souris WT (*wild-type* - cellules de type naturel ou sauvage) et pas chez les souris GPR120 KO [26]. Il est par ailleurs intéressant de noter que la sensibilité à l'insuline des souris GPR120 KO est inférieure à celle des souris WT avant même le début des diètes et l'influence des acides gras et de l'alimentation. En l'absence de GPR120, la sécrétion d'insuline est plus élevée de 31% chez les souris afin de contrecarrer la résistance et de maintenir la glycémie à l'intérieur des valeurs normales [26].

Les oméga-3 ont donc un potentiel bénéfique au niveau glycémique en augmentant la sensibilité à l'insuline et en réduisant la résistance périphérique (muscles, foie, adipocytes etc.). Cet effet passerait par le récepteur GPR120 dont la présence est essentielle pour l'amélioration de l'homéostasie glucidique par les oméga-3.

1.3.2 Réduction des signes d'anxiété et de dépression

Les oméga-3 agissent également sur le comportement anxio-dépressif et peuvent en réduire certains signes. Au niveau du comportement relié à l'anxiété, on retrouve plusieurs études animales et humaines qui se penchent sur le lien entre les oméga-3 et certains signes associés à l'anxiété.

Pour les études animales réalisées avec les rongeurs, il existe plusieurs tests qui permettent d'évaluer le comportement associé à l'anxiété tels que l'EPM (*elevated-plus maze* - test du labyrinthe en croix surélevée) et l'OFT (*open field test* - test de champ ouvert). Leur principe est basé sur la tendance des animaux à plus explorer un nouvel environnement lorsqu'ils ne sont pas anxieux. Dans le cadre de l'EPM, un comportement anxieux se traduit par un temps plus élevé passé dans les bras fermés et un temps moindre passé dans les bras ouverts et au centre du labyrinthe. Dans le cadre de l'OFT, un comportement anxieux se traduit par un temps plus élevé

passé près des murs de la boîte dans laquelle ils sont placés et un temps moindre passé au centre de celle-ci.

Les études animales mettent en avant des effets contraires et divergents des oméga-3 au niveau de l'anxiété. Plusieurs études démontrent par exemple que les oméga-3 ont un effet anxiogène chez les rongeurs. Les souris ayant un faible apport en oméga-3 (0,6 g/kg, représentatif de la diète occidentale actuelle) passent ainsi plus de temps au centre dans le cadre du test de l'OFT que les souris supplémentées en oméga-3 (14,2 g/kg) durant 4 mois [38]. Il en est de même dans le cadre de l'EPM, où les souris déficientes en oméga-3 (traces d'ALA/100g) passent significativement plus de temps dans les bras ouverts de l'EPM par rapport aux souris avec un apport adéquat (200 mg d'ALA/100g) [39]. Il est intéressant de noter que ces résultats n'ont été observés que chez les souris mâles et qu'aucune différence significative n'a été constatée chez les femelles [39].

Ces études suggèrent que les oméga-3 augmentent l'anxiété et qu'une déficience en ce type d'acide gras est associée à un comportement relié à l'anxiété moindre chez les rongeurs. Certains aspects de ces devis expérimentaux peuvent cependant expliquer ces résultats. Les souris déficientes en acides gras oméga-3 montrent ainsi un apprentissage moins efficace et une moins bonne compréhension de la situation que les souris avec un apport adéquat en oméga-3 [38] [39]. La différence de compréhension et de motivation à se mouvoir au sein de l'OFT et de l'EPM peut donc expliquer en partie la différence de comportement.

D'autres études démontrent quant à elles que les oméga-3 ont un effet anxiolytique et peuvent réduire certains signes reliés à l'anxiété. Les souris déficientes en oméga-3 (<6 mg d'ALA/100 g) passent ainsi moins de temps dans les bras ouverts de l'EPM par rapport aux souris ayant un apport adéquat (200 mg d'ALA/100 g) [40].

L'anxiété induite par cette « carence » en oméga-3 peut d'ailleurs être réduite à l'issue d'une supplémentation en DHA. Le temps passé dans les bras ouverts de l'EPM par les rats peut être augmenté significativement suite à l'administration de DHA (300 mg/kg/j durant 1 semaine) [41]. D'autre part, les oméga-3 permettent de se prémunir contre l'anxiété puisqu'une épreuve anxiogène et stressante est mieux tolérée chez les souris qui ont un apport adéquat en oméga-3 lors des périodes pré et post-natales [42].

Les divergences que l'on retrouve dans la littérature peuvent être expliquées par les différentes conditions expérimentales des tests de comportement dans les études. Ces paramètres (intensité

de la lumière, manipulation préalable aux tests de comportement, période d'acclimatation au nouvel environnement etc.) influent particulièrement sur le niveau de stress des animaux. Or, Fedorova *et al.* [43] ont montré que dépendamment du niveau de stress des animaux et des conditions environnementales, le comportement relié à l'anxiété varie au sein du même groupe. Des souris déficientes en oméga-3 et non soumises à des conditions stressantes passent par exemple plus de temps dans les bras ouverts de l'EPM. Cependant, ces résultats sont inversés en cas de stress intense et le groupe déficient passe moins de temps dans les bras ouverts de l'EPM. Le sexe de l'animal joue également dans la réponse comportementale aux oméga-3. Une diète déficiente en oméga-3 induit ainsi un effet significatif sur le niveau d'anxiété chez les souris mâles uniquement [43]. Aucune différence significative de comportement n'est décelée entre les femelles déficientes et celles ayant un apport adéquat en oméga-3 [43]. Il est donc primordial de bien contrôler les facteurs extérieurs qui peuvent influencer les résultats comportementaux et de tenir compte des caractéristiques propres aux animaux, en l'occurrence leur sexe.

Si les résultats des études animales sont divergents quant à l'impact des oméga-3 sur le comportement relié à l'anxiété, les études humaines s'accordent à dire que ces acides gras ont un effet anxiolytique et prophylactique. Une supplémentation en oméga-3 (2,25 g/j d'EPA, 500 mg/j de DHA et 250 mg/j d'autres types d'acides gras oméga-3) durant 3 mois peut réduire significativement le score d'anxiété des personnes sans antécédents de dépression ou démence, mesuré à partir d'un questionnaire d'auto-évaluation, le POMS (*Profiles of Mood States*) [44]. Il en est de même chez les jeunes personnes dont le niveau d'anxiété est réduit de 20% à l'issue d'une supplémentation en oméga-3 (2,496 g/j d'oméga-3 dont 2085 mg d'EPA et 348 mg de DHA) de 12 semaines [45].

Le taux sérique d'acides gras oméga-3 est d'ailleurs corrélé à une réduction de l'anxiété chez les humains ($r_{[w-3 \text{ total } \mu\text{g/ml}]} = -0,656, p = 0,028$), et cet effet est dû spécifiquement à l'EPA ($r_{[EPA \mu\text{g/ml}]} = -0,714, p = 0,014$) [44]. D'autre part, le taux sérique d'oméga-6 a l'effet inverse puisqu'il est corrélé positivement à l'anxiété ($r_{[\text{ratio } \omega 6 / \omega 3]} = + 0,34, p = 0,001$) [45]. Cela renforce l'idée du rôle anxiolytique des oméga 3 au potentiel anti-inflammatoire et de l'effet contraire procuré par les oméga 6 pro-inflammatoires. Les données suggèrent que l'anxiété est

associée à une inflammation périphérique puisque le niveau d'IL-6 pro-inflammatoire est réduit de 14% chez les individus supplémentés en oméga-3 par rapport au groupe placebo [45].

Les oméga-3 ont donc un potentiel anxiolytique chez l'homme et sont même efficaces à titre prophylactique pour prévenir l'anxiété. De plus, l'efficacité de la supplémentation ne se cantonne pas seulement aux personnes ayant des antécédents ou des troubles diagnostiqués d'anxiété, et s'adresse à la population générale.

Les mécanismes par lesquels les oméga-3 agissent sur l'anxiété restent cependant à élucider, même si certaines hypothèses peuvent être formulées en se basant sur quelques études. Les oméga-3 réduiraient ainsi l'anxiété par l'intermédiaire du récepteur GPR120 présent au niveau central (ventricule latéral) [46]. L'activation chronique de ce récepteur par un agoniste synthétique administré par une canule ICV (intracérébroventriculaire) réduit significativement le comportement relié à l'anxiété chez les souris ayant reçu une diète riche en gras. Cela se traduit par un temps plus important passé dans les bras ouverts de l'EPM et au centre de l'OFT chez les souris ayant reçu l'agoniste du GPR120. Le GPR120 central a donc des propriétés anxiolytiques lorsque activé de manière chronique par un agoniste synthétique et spécifique.

Les oméga-3 réduisent ainsi l'anxiété chez l'homme et leurs effets chez les animaux sont contradictoires selon les études. Ces acides gras agissent non seulement sur l'anxiété mais également sur la dépression.

Les causes exactes de la dépression ne sont pas connues à ce jour et plusieurs hypothèses sont avancées afin de mettre en lumière les mécanismes sous-jacents à cette pathologie qui touche plusieurs millions de personnes à travers le monde. Parmi les diverses étiologies de la dépression, on retrouve l'inflammation. Il existe ainsi une corrélation entre la présence de cytokines pro-inflammatoires (interféron- α) et le développement de la dépression [47]. Les patients souffrant de dépression ont tendance à avoir un taux plus élevé de marqueurs inflammatoires en périphérie, tels que le TNF- α , le NF κ B ou encore l'IL-6 [17].

Ces derniers interagissent avec divers mécanismes qui sont impliqués dans la dépression, en l'occurrence le métabolisme des neurotransmetteurs, la plasticité des neurones et les fonctions endocrines [17] [48]. Les cytokines pro-inflammatoires affectent en effet le métabolisme de la dopamine, de la sérotonine et de la norépinephrine, en agissant au niveau de la synthèse, de la sécrétion et de la recapture de ces neurotransmetteurs [17]. Il est par ailleurs intéressant de

constater que certaines classes d'antidépresseurs agissent sur cette étiologie inflammatoire en augmentant les taux de cytokines anti-inflammatoires tel que l'IL-10 (interleukine-10) [17], ce qui va dans le sens de l'association entre la neuro-inflammation et la dépression.

Les oméga-3 anti-inflammatoires constituent une piste intéressante à explorer en tant que traitement potentiel pour le traitement de la dépression associée à une inflammation [47]. Cet argument est d'autant plus valide que les personnes souffrant de dépression et ayant des taux élevés de cytokines inflammatoires ont tendance à être plus résistantes aux traitements conventionnels [49]. De plus, plusieurs études épidémiologiques suggèrent un effet protecteur des acides gras oméga-3 contre la dépression. La consommation de poisson réduit par exemple le risque de dépression de 22% et un apport quotidien de 1,8 g d'oméga-3 réduit ce risque de 70% [50]. Les personnes souffrant de dépression ont des taux sanguins plus faibles en oméga-3 (-0,51, $p < 0,0001$), EPA (-0,18, $p = 0,004$) et DHA (-0,35, $p = 0,0002$) par rapport aux personnes non dépressives [51]. Ces différences sont probablement reliées à un manque d'apport alimentaire en oméga-3 chez ces personnes.

Il est à noter cependant que les taux d'oméga-6 pro-inflammatoires ne sont pas nécessairement plus élevés chez les patients dépressifs [17]. Étant donné le lien entre la déficience en oméga-3 et l'augmentation du risque de dépression, plusieurs études cliniques se sont penchées sur l'effet de l'administration des oméga-3 sur le comportement de type dépressif. La supplémentation en oméga-3 (1,6 g/j EPA et 0,8 g/j DHA) des adultes dépressifs durant 6 semaines peut aider à réduire la sévérité des symptômes reliés à la dépression (humeur dépressive, culpabilité, désespoir, dévalorisation etc.) [52].

Les oméga-3 ne sont pas seulement bénéfiques chez les adultes dépressifs mais également chez les enfants atteints de dépressions graves. L'administration de 1000 mg/j d'oméga-3 (400 mg EPA et 200 mg DHA) durant 16 semaines permet de réduire significativement de plus de 50% les symptômes dépressifs mesurés sur l'échelle du CDRS (*Childhood Depression Rating Scale*) [53]. Il existe également une corrélation entre le pourcentage sérique de DHA et la réduction des symptômes dépressifs tels que définis sur l'échelle de Hamilton ($R^2 = 0,60$, $p = 0,004$) [52]. L'EPA sérique a quant à lui un effet inverse au niveau de l'amélioration des symptômes, dans la mesure où plus son pourcentage sérique est élevé, plus le score sur l'échelle de Hamilton est élevé ($R^2 = 0,58$, $p = 0,007$) [52]. Il ne faut cependant pas conclure en l'inefficacité de l'EPA dans la réduction de la dépression, puisqu'il peut être converti en DHA étant donné que les voies

enzymatiques utilisées par ces deux acides gras sont les mêmes [52]. De plus, l'EPA peut réduire le taux de conversion des oméga-6 pro-inflammatoires qui augmentent potentiellement les risques de dépression [52].

On retrouve dans la littérature certaines recommandations alimentaires en oméga-3 adressées spécifiquement aux personnes souffrant de dépression (1 g/j de DHA et EPA) [54], et celles-ci sont plus élevées que les recommandations pour la population générale (250-500 mg/j de DHA et EPA selon l'OMS [55]). Le fait que les oméga-3 soient recommandés en plus grande quantité dans le cadre de certaines maladies psychiatriques atteste de leur rôle en tant que traitement potentiel pour la dépression, plus particulièrement pour les formes de dépression ayant une étiologie inflammatoire.

De plus, il est conseillé d'ajouter une supplémentation en oméga-3 en tant qu'adjuvant aux traitements pour la dépression lorsque ceux-ci ne se révèlent pas efficaces chez certains patients souffrant de dépression sévère [56]. Une supplémentation en oméga-3 sous forme d'éthyle d'ester d'EPA (1 [57], 2 [57] [58] ou 4 g/j [57]) durant 4 semaines [58] et 16 semaines [57] réduit le score de dépression sur plusieurs échelles de manière significative. Les oméga-3 sont donc non seulement efficaces pour réduire les symptômes associés à la dépression, mais également pour augmenter l'efficacité des traitements antidépresseurs conventionnels chez les patients qui y sont résistants.

Au niveau des tests effectués chez les rongeurs, les oméga-3 ont le même effet antidépresseur que chez les humains. On observe en effet une réduction du comportement de type dépressif suite à une supplémentation en oméga-3, plus particulièrement une baisse de l'immobilité dans le cadre du FST (*forced swim test* - test de nage forcée qui permet de mesurer le comportement associé à la dépression chez les rongeurs).

Une diète riche en oméga-3 (0,70% ALA, 0,35% EPA, 0,14% DHA) de 6 semaines peut réduire significativement le temps d'immobilité des souris lors du FST [49]. Il en est de même lors de l'ajout d'oméga-3 par gavage (2,5 g/kg/j d'oméga-3 avec 70% ALA, 25% acide linoléique, 5% acide oléique) à une diète régulière (0,15% ALA) durant 6 semaines [49].

Par ailleurs, cette réduction de l'immobilité dans le cadre du FST serait plus attribuable au DHA qu'à l'EPA. Il existe ainsi une corrélation négative entre le taux de DHA cérébral et le temps d'immobilité ($r = -0,654$, $p = 0,006$), ce taux étant lui-même relié à l'apport alimentaire en

oméga-3 [59]. D'autre part, l'injection intra-péritonéale d'EPA n'a aucun effet sur le temps d'immobilité des souris, quelle que soit la dose administrée [60]. Lorsque l'EPA est ajouté à l'imipramine, une molécule au potentiel antidépresseur, le temps d'immobilité des souris n'est pas augmenté [60]. Le manque d'effet additionnel de l'EPA lorsque ajouté à l'imipramine ne doit cependant pas être généralisé à toutes les classes d'antidépresseurs qui agissent sur le temps d'immobilité à différentes échelles selon leurs mécanismes d'action. Il faut tenir compte également de l'effet initial de l'antidépresseur et de l'ampleur des changements de comportement. Les antidépresseurs qui agissent par exemple sur la sérotonine au niveau central s'avèrent être non efficaces dans le cadre du FST sur la réduction de l'immobilité contrairement à ceux qui agissent sur la dopamine [60]. Par conséquent, étant donné que l'imipramine est une molécule puissante qui réduit de manière importante le temps d'immobilité, il est difficile pour l'EPA de réduire davantage ce dernier significativement. L'EPA n'est donc pas efficace en présence d'imipramine, ce qui ne l'empêche pas d'augmenter l'efficacité d'autres antidépresseurs aux effets moins marqués.

Certaines données suggèrent quant à elles que c'est lorsque l'on combine l'EPA au DHA que les oméga-3 augmentent l'efficacité des traitements antidépresseurs chez les souris [49]. Ainsi, l'EPA et le DHA ajoutés à l'imipramine réduisent l'immobilité de 31% de plus que lorsque l'imipramine est administrée seule [49].

Les oméga-3 ont donc la capacité de réduire certains symptômes liés à la dépression chez les rongeurs et chez les humains. De plus, ces acides gras agissent sur divers types de dépressions que l'on retrouve chez les humains telles que les dépressions infantiles et associées à une inflammation.

1.3.3 Réduction de l'inflammation

Les acides gras de type oméga-3 ont des propriétés anti-inflammatoires et peuvent réduire les niveaux de cytokines en circulation dans l'organisme. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ces effets: les oméga-3 empêchent ainsi la production de prostaglandines et leukotriènes à partir des acides gras oméga-6 pro-inflammatoires, inhibent le facteur de transcription pro-inflammatoire NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) et modifient le profil des acides gras qui composent les membranes cellulaires [61].

En plus de réduire l'inflammation périphérique, les oméga-3 ont un effet anti-inflammatoire au niveau central en agissant notamment sur les cellules de la microglie.

1.3.3.1 La microglie

Les cellules de la microglie sont des cellules gliales présentes au niveau du cerveau et qui sont considérées comme les macrophages du système nerveux central. Elles font office de cellules immunitaires et peuvent phagocyter tout corps étrangers et éléments non désirables au niveau central, tels que des pathogènes et des cellules endommagées [62]. Elles sont également associées à la réparation des tissus et au développement du système nerveux central puisqu'elles sécrètent des facteurs de croissance et favorisent la synaptogénèse ainsi que la plasticité cérébrale [62].

La microglie joue un rôle important lors de l'inflammation centrale; elle « surveille » son environnement et s'active au moment opportun. La microglie s'active ainsi rapidement à la moindre détection de pathogènes ou d'éléments non désirables et induit un état inflammatoire.

Ces changements au niveau des cellules gliales ou gliose, répondent aux lésions du système nerveux central. Les ramifications des cellules forment un réseau de surveillance dense et efficace qui leur permet d'être en étroite communication avec l'environnement.

Les cellules microgliales peuvent avoir deux polarisations ou phénotypes (M1 et M2) qui se distinguent par leurs morphologies, leurs fonctions, leurs taux de sécrétion de cytokines et leurs protéines de surface [62]. La forme M1 activée est associée à une libération accrue de cytokines inflammatoires et la forme M2 non-activée (état de surveillance) est associée à une libération moindre ou une absence de sécrétion de cytokines inflammatoires [62].

Lorsque la microglie est activée, elle prend la forme M1 dite amiboïde et elle est capable de se mouvoir et de se déplacer. Sa configuration est sphérique, ses ramifications sont peu nombreuses ou absentes et elle est parée de multiples vacuoles qui peuvent phagocyter divers corps étrangers (pathogènes, cellules endommagées etc.). Les cellules M1 libèrent des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des dérivés réactifs de l'oxygène ou ROS (*reactive oxygen species*) [62].

Lorsque la microglie est au repos et non activée, elle prend la forme M2 qui est repérable à ses ramifications et prolongements qui forment un large réseau de surveillance. Au niveau inflammatoire, on observe une réduction ou une absence de sécrétion de cytokines

inflammatoires. En conditions inflammatoires, la polarisation des cellules microgliales change et les macrophages M2 expriment des gènes M1 afin de se transformer en macrophages M1 [63]. Outre la différence de morphologie et de fonctions, les deux phénotypes se distinguent par leurs métabolismes et les substrats énergétiques utilisés. Les cellules M1 se caractérisent par une augmentation de la glycolyse et de l'utilisation du glucose, de la production de lactate à travers la voie des pentoses phosphates et d'une réduction de l'utilisation de l'oxygène au niveau mitochondrial [63]. Les cellules M2 quant à elles se caractérisent par une consommation moindre de glucose et le recours à la respiration oxydative et à l'oxydation des acides gras pour la production d'énergie [63].

La qualité de l'alimentation influe sur le niveau d'activation de la microglie. Les acides gras saturés augmentent par exemple l'activation microgliale au niveau du noyau arqué et de l'hypothalamus chez les souris [10]. De plus, l'inflammation hypothalamique et l'activation microgliale sont visibles rapidement, soit trois jours après le début d'une diète riche en gras [11]. Le poids influe également sur le statut de la microglie. L'IMC est ainsi corrélé à une gliose élevée au niveau de l'hypothalamus médial basal chez les humains, mesurée par imagerie par résonance magnétique [10].

Les acides gras oméga-3 ont quant à eux l'effet inverse au niveau de l'inflammation centrale et de l'activité de la microglie. Le DHA réduit ainsi l'activation des cellules microgliales et la production d'IL-6 et de TNF- α médiée par celles-ci [10]. La microglie joue ainsi un rôle central dans la neuro-inflammation et la qualité de la diète influe sur son niveau d'activation.

1.3.3.2 Réduction de la neuro-inflammation

Les acides gras oméga-3 sont connus pour leur propriétés anti-inflammatoires et sont capables de réduire la neuro-inflammation. Ces acides gras agissent au niveau de la microglie et en réduisent l'activation. On observe non seulement une réduction des cytokines pro-inflammatoires mais également un changement de la polarisation des cellules microgliales.

Plusieurs études *in vitro* réalisées sur des cellules microgliales immortalisées ont démontré une réduction de l'inflammation par les acides gras oméga-3 en contexte d'inflammation aiguë. L'exposition des cellules BV2 au DHA (0,3, 3 et 30 $\mu\text{mol/L}$) suite au LPS (lipopolysaccharide) pro-inflammatoire réduit par exemple significativement les taux de TNF- α lorsque comparé aux cellules contrôles [64]. Le DHA possède par ailleurs un fort potentiel anti-inflammatoire

puisque'il est capable de réduire l'inflammation suite à l'exposition concomitante des cellules microgliales à deux molécules inflammatoires. On observe ainsi une réduction significative du TNF- α et de l'IL-6 à partir de 5 μ M de DHA, administré 30 minutes avant l'exposition à deux facteurs inflammatoires (LPS et IF γ [interféron gamma]) [65].

D'autres données suggèrent que l'efficacité des oméga-3 est augmentée lorsque l'EPA et le DHA sont administrés en concomitance lors d'une inflammation induite par le LPS. La réduction de TNF- α et IL-6 est plus importante lorsque les cellules sont exposées à l'EPA et au DHA par rapport aux cellules exposées à un seul type d'oméga-3 [66]. Ceci laisse supposer une synergie probable entre l'EPA et le DHA et une meilleure efficacité anti-inflammatoire. Cet effet est vérifié dans deux lignées microgliales immortalisées de souris (BV2 et MG6) [66].

Une grande partie des études est réalisée sur des cellules immortalisées et non pas sur des cellules microgliales primaires. Ceci est compréhensible dans la mesure où les manipulations qui précèdent l'isolement des cellules microgliales primaires sont fastidieuses et chronophages. Il faut en effet un délai d'au moins 6 semaines entre l'accouplement des souris et la culture des cellules avant de pouvoir procéder aux expériences (environ 3 semaines de gestation et 3 semaines de culture cellulaire).

Si les cellules microgliales immortalisées permettent d'effectuer plus rapidement les expériences *in vitro*, elles ne reflètent pas de manière fiable le comportement des cellules *in vivo* au niveau de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires suite à la stimulation par du LPS contrairement aux cellules microgliales primaires [67]. Le profil et la réponse inflammatoire des cellules immortalisées ne sont pas représentatifs de la réponse réelle des cellules dans l'organisme. Les taux de plusieurs cytokines (TNF- α , IL-1 β [interleukine-1 beta], IL-6, MCP-1 [*monocyte chemoattractant protein 1*]) produites par les cellules immortalisées BV2 et HAPI suite à la stimulation avec du LPS sont moindres que ceux obtenus avec des cellules microgliales primaires dans les mêmes conditions [67].

Pour une meilleure fiabilité des résultats, certaines études *in vitro* ont opté pour des cellules microgliales primaires. Le DHA (10 μ M et 20 μ M) réduit significativement la production d'IL-6 par les cellules primaires de rats exposées au LPS (10 ng/ml) ou à l'IF γ (200 U/ml) [68]. De plus, la combinaison de l'EPA et du DHA réduit de manière significative les taux de TNF- α suite à l'exposition au LPS à partir d'une concentration de 20 μ M d'EPA et de DHA [69]. Il en est de

même pour la sécrétion d'oxyde nitrique qui est abaissée significativement à partir de 20 μ M d'EPA et de DHA [69].

Les propriétés anti-inflammatoires des oméga-3 est confirmée chez les humains dans le cadre d'une étude *in vitro* réalisée sur des cellules microgliales immortalisées humaines (CHME3). Le DHA réduit de manière significative TNF- α en contexte d'inflammation aigüe (1 μ g/ml de A β 42 durant 24h), et l'effet le plus important est observé avec la concentration de 0,1 μ M de DHA [70]. Cependant, le DHA n'a pas d'impacts sur l'expression et la sécrétion de l'IL-6 et de l'IL-10 [70]. De plus, l'EPA n'a aucun effet sur les niveaux de TNF- α , IL-6 et IL-10 lorsque les cellules humaines CHME3 sont en conditions inflammatoires [70].

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la réduction de la neuro-inflammation. Les oméga-3 bloquent la voie NF κ B en empêchant la dégradation de l'I κ B [64], activent la voie SIRT1 (sirtuine 1) [66], inhibent la voie pro-inflammatoire p38 MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinases*) [68] et réduisent l'expression du récepteur membranaire TLR-4 (*toll-like receptor 4*) sur lequel se fixent les molécules inflammatoires tel que le LPS [64]. De plus, le DHA agit au niveau nucléaire en activant l'hétéro-dimère RXR-PPAR γ qui augmente la transcription des cytokines anti-inflammatoires et qui permet l'acquisition de la forme M2 anti-inflammatoire par les macrophages [71].

Les oméga-3 ne réduisent pas seulement les niveaux de cytokines pro-inflammatoires mais modifient également la polarisation des cellules microgliales immortalisées de souris. L'EPA et le DHA réduisent ainsi significativement l'expression des gènes correspondants à la forme activée M1 (TNF- α et iNOS [*nitric oxide synthase*]) des macrophages et augmentent celle de la forme non activée M2 (CD206 [*cluster of differentiation 206*] et TGF- β [*transforming growth factor beta*]) [69].

Les mêmes résultats sont observables chez les cellules immortalisées humaines [70]. En contexte non-inflammatoire, le DHA réduit significativement les marqueurs associés à la forme pro-inflammatoire de la microglie (CD40 [*cluster of differentiation 40*] et CD86 [*cluster of differentiation 86*]). De plus, le DHA augmente significativement le marqueur CD206 associé à la forme inactivée. L'EPA réduit également l'expression du marqueur CD86 de la forme activée M1, sans toutefois avoir d'impacts sur la forme inactivée M2. En contexte d'inflammation aigüe, le DHA réduit significativement le marqueur CD86 des cellules M1 activées sans toutefois

augmenter la forme inactivée M2. Il en est de même pour l'EPA qui réduit significativement les marqueurs de la forme M1 (CD40 et CD86), sans affecter la forme M2. La littérature montre donc que les acides gras oméga-3 agissent sur les cellules microgliales immortalisées et primaires des rongeurs et sur les cellules microgliales humaines immortalisées en réduisant l'inflammation et en modifiant la polarisation des macrophages au profit du type M2 anti-inflammatoire. Plusieurs hypothèses suggèrent que les effets anti-inflammatoires des oméga-3 passent par le récepteur GPR120 qui est activé par ces acides gras.

1.4 Le GPR120

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) sont une famille de récepteurs de surface cellulaire qui possèdent de nombreuses fonctions cellulaires. La famille des GPCR est composée de plus de 850 récepteurs qui sont exprimés dans divers tissus et qui ont des fonctions spécifiques dans l'organisme [34]. Ces récepteurs sont activés par plusieurs stimuli comme les acides gras, les neurotransmetteurs, les hormones et la lumière, ce qui déclenche la signalisation cellulaire [34]. Les GPCR possèdent des structures communes tel qu'une extrémité N-terminale, une extrémité C-terminale et sept domaines transmembranaires [72]. Cette classe de récepteur est d'ailleurs considérée comme étant une cible intéressante pour les traitements, et environ 30% des traitements médicamenteux ciblent les GPCR [34].

Le GPR120 (*G-protein coupled receptor 120*) ou FFA4 (*free-fatty acid receptor-4*) est un récepteur membranaire faisant partie de la familles des GPRCR et qui est présent dans de multiples organes et cellules (macrophages et certaines cellules exocrines). Il se situe autant en périphérie qu'au niveau central et possède de nombreuses propriétés telles que des propriétés anti-inflammatoires. Il existe deux classes de ligands qui activent le GPR120: les agonistes naturels et synthétiques. Les agonistes naturels du GPR120 sont les acides gras insaturés de 16 à 22 carbones et les acides gras saturés de 14 à 18 carbones [73]. Parmi ces acides gras, figurent les oméga-3, les oméga-6 et les oméga-9. Les oméga-3 sont cependant plus efficaces que les oméga-6 et 9 pour activer le GPR120 [73]. Les agonistes synthétiques du GPR120 sont quant à eux des molécules dont la structure est conçue pour activer spécifiquement le récepteur. C'est le résidu carboxyle du ligand qui interagit avec l'Arginine du récepteur et qui s'y lie, ce qui permet l'activation du GPR120 [72].

Ce récepteur constitue une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement de pathologies ayant une étiologie inflammatoire comme l'obésité, le diabète, les maladies pulmonaires ou encore le cancer [72].

1.4.1 Propriétés métaboliques et anti-inflammatoires du GPR120

Le GPR120 possède de nombreuses propriétés métaboliques bénéfiques. Sa stimulation permet d'améliorer la tolérance au glucose [25] et la sensibilité à l'insuline des muscles et du foie [25] [26]. La sécrétion d'insuline est ainsi abaissée suite à l'activation du récepteur [25], ce qui témoigne d'une meilleure sensibilité à l'insuline. Le GPR120 améliore également le métabolisme des lipides du foie et réduit la stéatose hépatique [25].

De plus, le FFA4 est impliqué dans l'effet anti-inflammatoire des oméga-3 *in vivo* et peut réduire l'inflammation liée à l'obésité et au diabète de type 2 [24]. La stimulation du GPR120 des macrophages réduit ainsi les niveaux de cytokines pro-inflammatoires M1 (IL-6, IL-1 β , MCP-1) et augmente les cytokines anti-inflammatoires M2 (IL-10, arginase-1) [26].

D'autre part, l'activation chronique du GPR120 central réduit le comportement relié à l'anxiété chez les souris [46]. On observe également une réduction de la prise alimentaire et de la motivation alimentaire [46]. Ceci se traduit chez les souris par une baisse significative de la consommation de boulettes de nourriture riches en gras et fructose.

1.4.2 Distribution du GPR120

Nous avons démontré par qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) que le GPR120 se trouve dans divers tissus de l'organisme avec une forte expression au niveau des poumons et du tissu adipeux. La présence de ce récepteur a également été démontrée dans le cerveau (Figure 3).

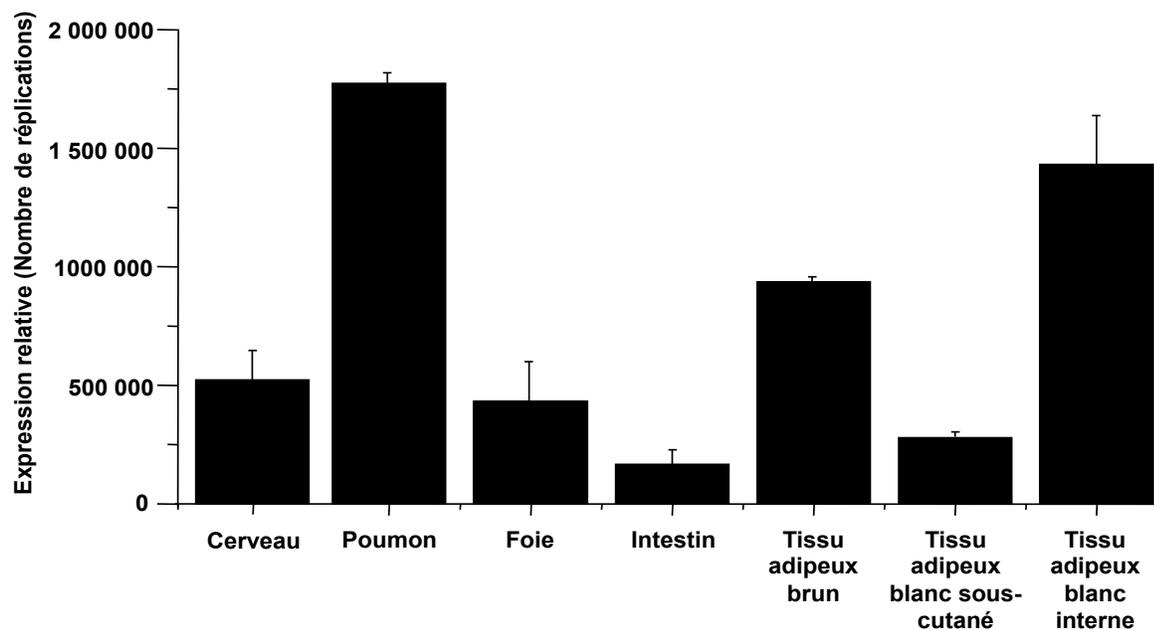


Figure 3. Répartition du GPR120 dans l'organisme. Les valeurs représentent la moyenne (\pm SEM) de l'expression génique du GPR120 dans différentes régions de l'organisme, mesurée par qPCR.

Afin de déterminer spécifiquement les régions cérébrales dans lesquelles se trouve le GPR120, diverses coupes de cerveau ont été prélevées sur des souris et le niveau d'expression du récepteur a été évalué par qPCR. Les résultats obtenus suggèrent une répartition homogène et uniforme du GPR120 au niveau des différentes régions cérébrales, puisque l'expression du récepteur y est comparable (Figure 4).

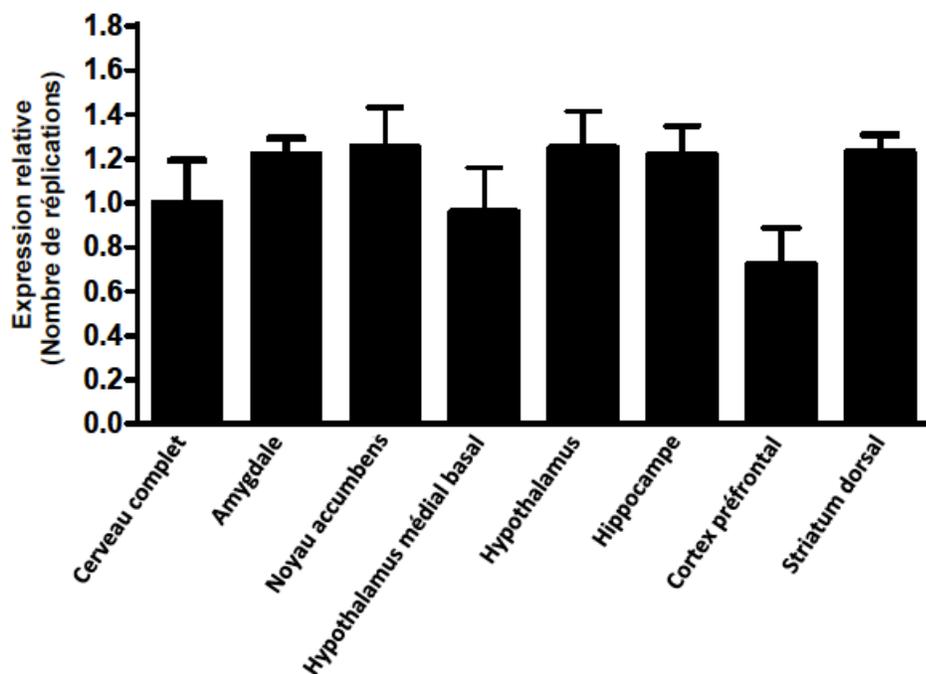
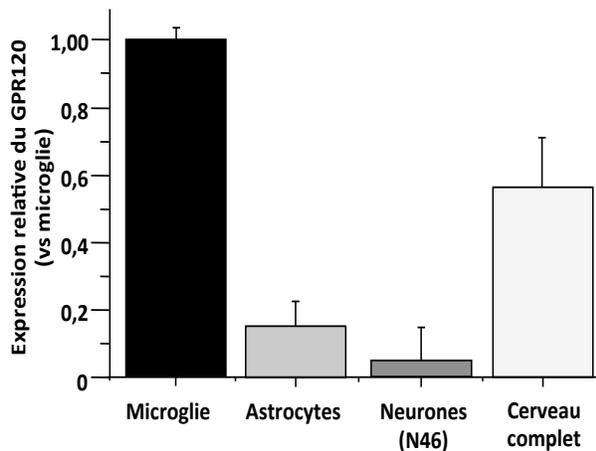


Figure 4. Répartition cérébrale du GPR120. Les valeurs sont normalisées par rapport au cerveau complet et représentent la moyenne (\pm SEM) de l'expression génique du GPR120 dans différentes régions du cerveau des souris, mesurée par qPCR.

Par la suite, nous avons démontré par qPCR que le GPR120 est très fortement exprimé au niveau de la microglie par rapport aux autres types de cellules cérébrales (neurones et astrocytes) (Figure 5). Ces résultats ont été obtenus chez les souris sur des cellules cérébrales primaires (sauf les neurones N46) (Figure 5A) et chez l'humain sur des cellules cérébrales immortalisées (Figure 5B).

Il est intéressant de noter que la répartition cellulaire du GPR120 au niveau central chez l'humain est très proche de celle trouvée chez les souris. L'expression du GPR120 est en effet la plus élevée dans la microglie chez les deux espèces et on retrouve le même motif d'expression du GPR120 au niveau du cerveau (Figures 5A et 5B).

A



B

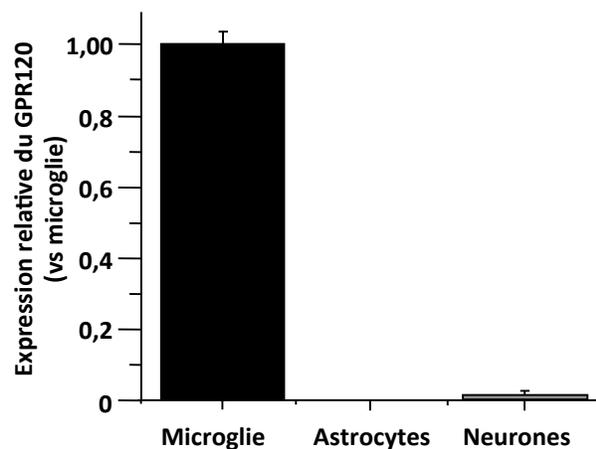


Figure 5. Répartition cellulaire du GPR120 au niveau du cerveau chez les souris (A) et les humains (B). Les valeurs sont normalisées par rapport à l'expression du GPR120 microglial chez les souris (A) et chez les humains (B) et représentent la moyenne (\pm SEM) de l'expression génique du GPR120 dans divers types de cellules cérébrales, mesurée par qPCR. Les expériences chez les souris ont été réalisées sur des cellules microgliales et astrocytaires primaires et sur des neurones de type N46 immortalisés. Toutes les expériences chez l'humain ont été réalisées sur des cellules humaines cérébrales immortalisées.

Du fait de la ressemblance au niveau de la répartition cérébrale du GPR120 entre les souris et les humains, les résultats obtenus chez les souris suite à la stimulation du GPR120 microglial donnent une idée de ceux que l'on pourrait potentiellement obtenir chez l'homme.

Il faut toutefois interpréter ces données avec précaution, puisque le niveau d'expression des cellules cérébrales a été mesuré sur deux types de cellules différentes: primaires pour les souris (Figure 5A) et immortalisées pour les humains (Figure 5B). La comparaison de la répartition du

GPR120 au niveau du cerveau chez les souris et chez les humains doit donc être faite en tenant compte de ces aspects.

1.4.3 Signalisation du GPR120

Les voies de signalisation et l'effet du GPR120 périphérique activé diffèrent dépendamment du type de cellule. Au niveau des macrophages (dont la microglie), l'activation du GPR120 induit l'internalisation de la protéine β -arrestine-2 qui se lie à la protéine TAB1 (*TGF-beta activated kinase 1 [MAP3K7] binding protein 1*) [72]. Celle-ci ne peut plus se lier à la kinase TAK1 (*TGF-beta activated kinase 1*) qui demeure par conséquent non activée. Étant donné que le TAK1 favorise certaines voies pro-inflammatoires telles que celles du NF κ B, le GPR120 des macrophages joue un rôle important dans la réduction de l'inflammation.

L'effet anti-inflammatoire passe par l'inhibition de divers facteurs de transcription pro-inflammatoires; IKK (I κ B kinase), JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) etc. Au niveau des cellules sécrétoires et exocrines, l'activation du GPR120 induit une libération d'incrétines et une élévation intracellulaire de calcium [72].

L'exposition du GPR120 de cellules microgliales humaines immortalisées (HEK293) aux oméga-3 se traduit d'ailleurs par une augmentation du calcium intra-cellulaire ainsi que par la phosphorylation du récepteur [74]. Cette augmentation calcique est proportionnelle à la concentration des oméga-3 à laquelle sont soumises les cellules [74].

1.5 Contribution au projet

Dans le cadre de ce projet, plusieurs expériences ont été menées afin d'étudier le rôle du GPR120 microglial sur la neuro-inflammation *in vitro*, ainsi que l'effet des oméga-3 *in vivo* sur le comportement anxio-dépressif et le métabolisme.

Les expériences ont été réalisées en collaboration avec Jérôme Roy, étudiant au post-doctorat et membre du laboratoire du Dr Stéphanie Fulton et du Dr Thierry Alquier au Centre de recherche du CHUM. Diverses expériences ont été effectuées par Jérôme Roy et moi-même, telles que les expériences *in vitro*, la mesure des cytokines par qPCR et les paramètres métaboliques (glycémie et lipides en circulation). Les tests de morphologie de la microglie *in vitro* et les tests de comportement ont été effectués au complet par moi-même. Les graphiques de la distribution du GPR120 (Figures 3, 4 et 5) ont quant à eux été réalisés entièrement par Jérôme Roy.

2. Problématique, hypothèse, objectifs et questions de recherche

2.1 Effets des oméga-3 *in vivo*

2.1.1 Problématique

L'obésité et le diabète augmentent considérablement l'incidence de la dépression et des troubles anxieux. L'activation immunitaire plus importante que l'on retrouve chez les personnes obèses [12] peut contribuer au dysfonctionnement de l'humeur puisque certaines formes de dépression ont une étiologie neuro-immune et inflammatoire [17]. Ces conditions sont croissantes dans nos environnements obésogènes et il est essentiel de mettre au point de nouveaux traitements afin de freiner ces épidémies. De plus, une partie des personnes souffrant de ces conditions est résistante à son traitement, d'où l'importance de mettre au point de nouvelles thérapies.

2.1.2 Hypothèse

Nous formulons l'hypothèse qu'une supplémentation en acides gras oméga-3 va réduire le comportement anxio-dépressif de souris en inflammation chronique induite par une diète préalable riche en gras saturés. De plus, étant donné l'effet positif des acides gras oméga-3 sur le métabolisme *in vivo*, nous formulons que la supplémentation en oméga-3 va améliorer la glycémie des souris supplémentées, ainsi que le profil des lipides en circulation.

2.1.3 Objectifs

- Étudier l'effet des acides gras oméga-3 *in vivo* sur le comportement anxio-dépressif chez des souris ayant reçu une diète prolongée en acides gras saturés durant 8 semaines..
- Étudier l'effet des acides gras oméga-3 *in vivo* sur la glycémie et le profil des lipides en circulation.

2.1.4 Questions de recherche

- Quel est l'effet des acides gras oméga-3 *in vivo* sur le comportement anxio-dépressif?
- Quel est l'effet des acides gras oméga-3 *in vivo* sur le métabolisme (glycémie et lipides en circulation)?

2.1.5 Pertinence de l'étude

L'épidémie d'obésité est croissante dans notre société et entraîne avec elle des troubles de l'humeur. Ces deux conditions sont en effet reliées et les personnes obèses ont 55% plus de risque d'être atteints de dépression [15]. De plus, les risques de maladies métaboliques augmentent avec l'obésité. Les acides gras oméga-3 anti-inflammatoires sont une piste intéressante à explorer dans le cadre de l'obésité et des troubles de l'humeur secondaires à l'inflammation. Par ailleurs, il est pertinent de mettre au point de nouveaux traitements pour l'anxiété et la dépression puisqu'une grande partie des personnes qui en sont atteintes sont résistantes à leurs traitements.

2.1.6 Méthodologie et déroulement de la recherche

2.1.6.1 Groupes de souris

Afin d'évaluer le rôle du GPR120 au niveau du comportement anxio- dépressif, de la glycémie et des lipides en circulation, 40 souris mâles provenant de la compagnie « *Jackson Laboratory* » et âgées de cinq semaines ont été mises sur quatre types de diètes différentes durant plusieurs semaines. Aucune souris femelle n'a été utilisée dans les expériences avec les mâles puisque les réponses physiologiques, métaboliques et comportementales diffèrent selon le sexe des souris. Les femelles sont par exemple plus résistantes aux altérations métaboliques (hyperglycémie, hyperinsulinémie, hypercholestérolémie etc.) et à la prise pondérale que les mâles suite à une diète riche en acides gras saturés [75]. C'est la raison pour laquelle la cohorte n'a été formée que par des souris mâles pour obtenir des résultats homogènes et visibles au niveau des expériences. Au départ, les 40 souris ont été divisées en deux groupes de 20 souris chacun et ont reçu durant 8 semaines une diète contrôle réduite en lipides (Ctrl – *control diet*, 17% des calories provenant des lipides) ou une diète riche en acides gras saturés à base d'huile de palme (HFD – *high fat diet*, 50% des calories provenant des lipides). Chaque cage contenait au départ 4 souris mâles et ceux-ci étaient surveillés régulièrement afin de s'assurer de leur entente et de déceler des signes éventuels d'agressivité ou de domination (traces de sang/morsures, isolement d'une souris du groupe etc.).

À l'issue des 8 semaines de diètes Ctrl et HFD, les deux groupes ont chacun été divisés en deux, soit quatre groupes de 10 souris. Ces quatre groupes ont reçu une diète différente durant 6 autres semaines. Le premier groupe de souris (Ctrl), précédemment sur diète Ctrl, a continué de recevoir

cette diète, pour un total de 14 semaines consécutives. Le second groupe est passé de la diète Ctrl à une diète isocalorique riche en acides gras oméga-3 (Ctrl + FO – *control diet + fish oil*, 17% des calories provenant des lipides), dont 27% des lipides totaux sont constitués par de l’huile de Menhaden source d’acides gras oméga-3. Le troisième groupe (HFD), précédemment sur diète riche en acides gras saturés, a continué de recevoir cette diète, pour un total de 14 semaines consécutives. Le quatrième groupe (HFD + FO – *high fat diet + fish oil*, 50% des calories provenant des lipides), précédemment sur diète riche en acides gras saturés, a reçu une diète isocalorique riche en oméga-3 dont 27% des lipides totaux sont constitués par de l’huile de Menhaden. Les quatre diètes proviennent de la compagnie « *Dyets* ». Les informations relatives aux groupes de souris et aux diètes reçues par les 4 groupes sont schématisées par la figure 6.

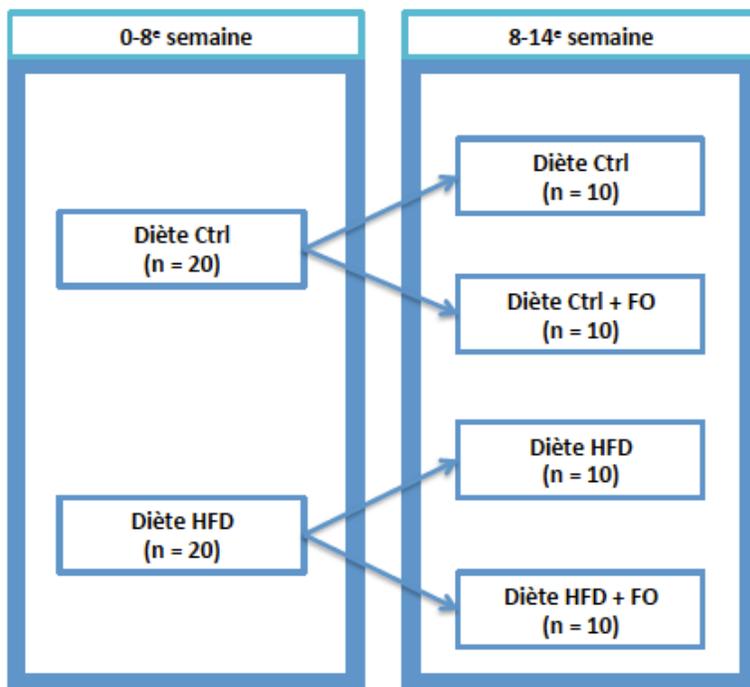


Figure 6. Groupes de souris et types de diètes reçues.

Les animaux ont été manipulés le moins possible afin de ne pas les stresser, de ne pas fausser les résultats comportementaux et les analyses métaboliques. C’est la raison pour laquelle les souris des quatre groupes n’ont été pesées qu’une seule fois par semaine pour le suivi pondéral. Parallèlement, la nourriture a été pesée et changée deux fois par semaine afin d’assurer un meilleur contrôle de la qualité de l’alimentation. La conservation des acides gras oméga-3 est en effet délicate puisque ces acides gras rancissent rapidement. La diète a ainsi été changée deux

fois par semaine et comblée à chaque fois jusqu'à 25 g/souris, pour un total de 50 g de nourriture par semaine. La prise alimentaire a également été mesurée par la pesée du restant de nourriture deux fois par semaine.

En vue des tests de comportement et afin d'en faciliter le déroulement ultérieur, les souris ont été mises dans des cages individuelles à la 11^{ème} semaine de diète. Toutefois, cette séparation a eu un impact chez plusieurs souris, ce qui s'est manifesté par une perte de poids modeste et une réduction de l'apport alimentaire durant 2 semaines.

2.1.6.2 Déroulement des tests de comportement

À l'issue des 14 semaines de diète, trois tests de comportement ont été effectués afin de mesurer l'effet des acides gras oméga-3 sur le comportement anxio-dépressif chez les souris, suite à un apport en acides gras saturés de 8 semaines. Les tests réalisés sont les suivants: le test du labyrinthe en croix surélevée (EPM – *elevated-plus maze*), le test de champ ouvert (OFT – *open field test*) et le test de nage forcée (FST – *forced swim test*). Les tests ont chacun été effectués une seule fois, afin d'éviter tout phénomène d'habituation aux tests. Les souris étaient donc « naïves » aux tests (non pré-testés) dans la mesure où il s'agissait de leur première exposition à ceux-ci.

Le test du labyrinthe en croix surélevé est un test qui permet de mesurer l'anxiété chez les rongeurs en tenant compte de plusieurs paramètres. Les souris sont placées individuellement durant cinq minutes au centre d'un labyrinthe surélevé en forme de croix. Ce dernier est formé de deux bras « ouverts » ne comportant pas de murs et deux autres bras « fermés » qui sont délimités par des murs. L'appareil est nettoyé entre chaque passage de souris à l'éthanol à 70% afin de retirer les odeurs et traces des souris précédentes et éviter de biaiser les comportements.

Au cours du test, les déplacements des souris au sein des différentes zones du labyrinthe sont analysés. Moins les souris sont anxieuses, plus elles explorent un nouvel environnement.

Une souris non anxieuse passe ainsi plus de temps dans les bras ouverts du labyrinthe et moins de temps dans les bras fermés. Une souris anxieuse au contraire se « réfugie » près des murs et passe moins de temps au centre et dans les bras ouverts.

Les déplacements et comportements des souris sont enregistrés par une caméra placée au dessus de l'appareil et les paramètres mesurés sont par la suite analysés par un logiciel (*EthoVision XT* –

Noldus Information Technology). Ces paramètres sont le temps passé dans les différentes parties du labyrinthe ainsi que la distance totale parcourue durant les cinq minutes de test.

Ce dernier paramètre est crucial car il permet de savoir si les différences de temps entre les groupes dans les zones du labyrinthe sont attribuables à un effet de la diète sur le comportement ou à une différence de locomotion entre les groupes. Lorsque la distance moyenne parcourue par deux groupes n'est pas significativement différente ($p > 0,05$), la différence de comportement des souris peut être imputable à l'unique action de la diète (dans notre cas à l'action des oméga-3).

Dans le cas contraire ($p < 0,05$), il est plus difficile d'interpréter les résultats puisque les divergences de comportement peuvent être dues à une différence de locomotion et/ou à un effet réel de la diète.

Le test de champ ouvert est un test qui permet également de mesurer l'anxiété chez les rongeurs en tenant compte de plusieurs paramètres. Les souris sont placées individuellement durant cinq minutes dans une boîte carrée de 40 cm de côté aux murs surélevés, et filmées par une caméra positionnée au dessus de celle-ci. L'appareil est nettoyé entre chaque passage de souris à l'éthanol à 70% afin de retirer les odeurs et traces des sujets précédents et éviter de biaiser les comportements.

Au cours de ce test, les déplacements des souris dans les différentes zones de la boîte sont enregistrés et analysés par le biais d'un logiciel (*EthoVision XT – Noldus Information Technology*). Les aires de la boîte définies sont le centre (1/4 de la superficie de la boîte), la périphérie (3/4 de la superficie de la boîte incluant le centre) et les murs.

Une souris non anxieuse passe plus de temps au centre contrairement à une souris anxieuse qui est plus encline à rester en périphérie et proche des murs. Ainsi, plus le temps passé au centre et le nombre d'entrée au centre sont élevés, moins la souris est anxieuse. La locomotion est également mesurée à travers la distance parcourue et comparée entre les groupes. Ce paramètre permet de déterminer si les observations sont attribuables à un effet de la diète sur le comportement ou à une différence de locomotion entre les groupes.

Le test de nage forcée est quant à lui un test qui permet de mesurer le comportement de type dépressif chez les rongeurs en tenant compte de plusieurs paramètres. Les souris sont placées

individuellement durant 6 min dans un b cher en verre translucide de 15 cm de diamètre, rempli de 1600 ml d'eau à température ambiante ($23 \pm 2^\circ\text{C}$).

Les mouvements des souris sont enregistrés par un logiciel (*EthoVision XT – Noldus Information Technology*) qui analyse divers paramètres en lien avec le test dont le temps de mobilité et d'immobilité. Le seuil d'immobilité est défini à 2,5%, une souris dont la mobilité par seconde est inférieure à 2,5% est considérée comme étant immobile. Un comportement associé à la dépression se manifeste par une augmentation du temps d'immobilité et une réduction du temps passé à nager, soit de la mobilité [76].

Seules les quatre dernières minutes du test sont analysées, puisque l'on estime que les deux premières constituent une période d'acclimatation et d'adaptation des souris à la situation, et ne reflètent pas un comportement quelconque relié à la dépression.

L'ensemble des tests a été réalisé sur les souris en six jours, de 8h   10h. Chaque test a été effectué sur deux jours puisque les quatre groupes ont chacun été divisés en deux (5 souris provenant de chaque groupe). Le comportement de la moitié du nombre de souris a ainsi été testé par jour. Cette configuration de passage et de plage horaire a été déterminée afin de terminer les tests avant 10h, heure à laquelle a lieu le changement de cycle des animaux qui sont en cycle inversé. Les souris sont en effet des rongeurs nocturnes qui sont actifs durant la nuit, dans l'obscurité (période d'éveil) et leur métabolisme varie selon le moment de la journée.

Les souris sont donc placées dans des salles dites en cycle inversé afin d'inverser les périodes d'éveil et de repos. Les lumières s'éteignent ainsi dans ces salles de 10h   22h afin de mimer artificiellement leur période d'éveil et pouvoir les manipuler au cours de la journée.

En tenant compte de ce facteur, on réduit les sources de variabilité entre les groupes. Les souris ont passé les trois tests de comportement avec un jour d'intervalle entre chacun afin de leur donner l'occasion de se « remettre » du test et d'éviter de fausser les résultats des suivants.

La chronologie des tests a été pensée et choisie minutieusement, en procédant par ordre croissant de tests stressants afin de ne pas biaiser les résultats suivants. On évite ainsi que les souris soient stressées par les tests précédents le jour des tests suivants. C'est la raison pour laquelle le test de nage forcée a été effectué en dernier car étant le plus stressant et le plus perturbant pour les souris.

Afin de minimiser les différences entre les deux journées durant lesquelles les mêmes tests de comportement ont été effectués, les conditions expérimentales ont été reproduites. Ainsi, la période de temps (8h à 10h) et l'ordre de passage des groupes et des souris a été respecté. De plus, les souris ont été amenées dans la salle des tests au moins 30 minutes avant le début de ceux-ci afin de réduire leur stress et leur permettre de s'habituer au nouvel environnement. Par ailleurs, les sources de stress ont été contrôlées au maximum en veillant notamment à éliminer tout bruit aux alentours de la salle durant le déroulement des tests.

Les données recueillies pour chacun des tests ont été analysées par ANOVA (*analysis of variance*) à 1 ou 2 facteurs (*one-way* ANOVA ou *two-way* ANOVA), suivi du test de comparaison de Bonferroni. Le seuil de signification de 0,05 a été choisi.

Les calculs statistiques et les graphiques ont été effectués avec le logiciel *GraphPad*, et les valeurs aberrantes ont été identifiées avec le logiciel *GraphPad-Outlier calculator* et exclues des analyses statistiques.

2.2 Stimulation du GPR120 microglial *in vitro*

2.2.1 Problématique

L'environnement obésogène qui caractérise notre société pousse les individus à une surconsommation d'aliments riches en gras et sucre. En parallèle de cela, on assiste à une épidémie croissante d'obésité et de problèmes de poids. La qualité de l'alimentation affecte le niveau d'inflammation périphérique et centrale de l'organisme. Un apport chronique en lipides saturés entraîne par exemple une élévation des marqueurs immunitaires et inflammatoires circulants et active la microglie [10]. La microglie activée sécrète des cytokines pro-inflammatoires et peut induire une neuro-inflammation qui est associée à des troubles de l'humeur et à un état dépressif important [17].

D'un autre côté, le GPR120 microglial aurait un potentiel anti-inflammatoire et pourrait atténuer l'activation de la microglie et l'inflammation hypothalamique induite par un apport prolongé en graisses saturées [10]. Il est ainsi essentiel de bien comprendre l'effet de ce récepteur sur l'inflammation qui peut être modulé par le type d'acides gras ingéré.

2.2.2 Hypothèse

Nous postulons que l'activation du GPR120 microglial *in vitro* en contexte inflammatoire aiguë va réduire la neuro-inflammation et l'activation de la microglie. Cela se traduira par une réduction de l'expression génique et protéique de diverses cytokines pro-inflammatoires. De plus, la polarisation des cellules de la microglie sera modifiée suite à l'activation du GPR120, avec une augmentation du phénotype M2 anti-inflammatoire et une réduction du phénotype M1 inflammatoire.

2.2.3 Objectifs

- Déterminer le rôle du GPR120 de la microglie au niveau de la neuro-inflammation en contexte d'inflammation aiguë *in vitro* sur des cellules microgliales primaires en activant ce récepteur par un agoniste synthétique spécifique (CpdA).
- Confirmer le rôle du GPR120 microglial dans la réduction de la neuro-inflammation en réitérant les expériences *in vitro* sur des cellules microgliales primaires KO (*knockout*) afin de voir l'impact de son absence sur le niveau d'inflammation.
- Étudier l'effet de la stimulation du GPR120 sur l'activation et le phénotype des cellules de la microglie *in vitro*.

2.2.4 Questions de recherche

- Quel est l'impact de la stimulation du GPR120 microglial *in vitro* sur le niveau d'inflammation centrale?
- Quel est l'effet de l'absence du GPR120 microglial sur le niveau d'inflammation?
- Comment se traduit la stimulation du GPR120 microglial sur le phénotype de la microglie?

2.2.5 Pertinence de l'étude

Malgré un intérêt significatif et grandissant de l'industrie pharmaceutique dans le développement d'agonistes du GPR120 pour le traitement de l'obésité et du diabète de type 2, on sait peu de choses sur ses effets. Peu d'études se sont penchées sur l'effet spécifique du GPR120 sur la neuro-inflammation. Les résultats préliminaires suggèrent un fort potentiel pour les agonistes du GPR120 (CpdA, oméga-3 etc.) pour atténuer la neuro-inflammation induite par l'alimentation.

La présente étude se démarque des précédentes réalisées sur la neuro-inflammation, puisqu'elle a été effectuée sur des cellules microgliales primaires et non sur des cellules immortalisées comme la majorité des études. L'utilisation de cellules primaires donne en effet un meilleur reflet au niveau de l'inflammation, contrairement aux cellules immortalisées [67].

Nos résultats ont été par la suite confirmés par des expériences effectuées sur des cellules de souris transgéniques de type $CX_3CR1^{CreER/+};GPR120^{fl/fl}$. Le gène du GPR120 de ces cellules microgliales est inactivé, ce qui permet d'apprécier l'effet de l'absence de ce récepteur sur l'inflammation centrale.

2.2.6 Méthodologie et déroulement de la recherche

2.2.6.1 Types de souris utilisées

Le volet cellulaire du projet a été effectué sur des cellules microgliales primaires prélevées à partir de cerveaux de souris âgées de 1 à 2 jours. Les expériences ont été réalisées autant sur des cellules provenant de souris de type WT que sur des souris KO dont le récepteur GPR120 microglial a été invalidé par le système de recombinaison Cre-Lox.

Afin d'invalider le gène correspondant au GPR120 de la microglie, les cellules microgliales de souris transgéniques de type $CX_3CR1^{CreER/+};GPR120^{fl/fl}$ ont été prélevées et exposées à des doses de Tamoxifène durant une période de 72h *in vitro*.

Les souris CX_3CR1^{CreER} (*chemokine [C-X3-C motif] receptor 1*) expriment une protéine de fusion Cre-ER (Cre recombinase) et EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) fluorescente au niveau des cellules immunitaires périphériques et de la microglie [77]. L'activation de l'enzyme Cre par le Tamoxifène se fait autant dans les cellules CX_3CR1^+ périphériques que centrales au niveau des sites LoxP qui entourent les fragments d'ADN à cliver. L'efficacité et la spécificité de la recombinaison chez ce type de souris sont élevées au niveau de la microglie, attestant de la fiabilité du modèle utilisé [78].

Ces souris sont par la suite croisées avec un autre de type de souris ($GPR120^{fl/fl}$) dont l'ADN correspondant au GPR120 est entouré de 2 sites LoxP disposés dans la même orientation. Cette configuration des sites LoxP permet d'obtenir des souris dont le GPR120 microglial peut potentiellement être invalidé [79]. Le croisement donne lieu à des souris de type $CX_3CR1^{CreER/+};GPR120^{fl/fl}$ qui, lorsqu'elles sont exposées à des doses de Tamoxifène, verront leur GPR120 microglial « retiré » et invalidé. Le Tamoxifène active en effet l'enzyme Cre qui

reconnaît les sites LoxP situés de part et d'autre du fragment d'ADN à délaisser et clive celui-ci. L'ADN correspondant au promoteur CX₃CR1 qui concerne les macrophages en périphérie et la microglie au niveau central est donc clivé. Ainsi, ce type de souris transgénique permet de manipuler au moment désiré la fonction microgliale et l'expression du locus CX₃CR1 qui est spécifique à la microglie au niveau central [80].

Outre le fait de pouvoir induire le KO au moment voulu, l'un des avantages essentiels est que ce type d'inactivation génique réduit le risque et l'ampleur des mécanismes de compensation. Ces mécanismes sont souvent mis en place durant le développement des souris, particulièrement chez celles dont l'inactivation génique est effectuée au stade embryonnaire [81]. En optant pour une inactivation conditionnelle des gènes par le biais du système Cre-Lox, on réduit les risques d'adaptation aux mutations qui ont lieu durant leur développement [82].

Les expériences menées sur les souris Cre-Lox sont donc plus fiables et représentatives de la fonction réelle des gènes inactivés, soit de l'implication du GPR120 microglial au niveau de la neuro-inflammation.

D'autre part, la recombinaison effectuée est stable dans le temps tel que rapporté dans la littérature. Les cellules CX₃CR1⁺ présentes au niveau central (microglie) sont en effet toujours recombinées 30 jours après l'induction du KO, contrairement aux cellules CX₃CR1⁺ périphériques (macrophages et monocytes circulants) qui sont renouvelées et ne sont plus recombinées [78]. Cette différence est due à la période de renouvellement ou au *turn-over* qui est plus lent chez les cellules de la microglie par rapport aux cellules périphériques.

Ainsi, le modèle de souris utilisé (CX₃CR1^{CreER/+};GPR120^{fl/fl}) permet d'avoir des rongeurs dont le GPR120 microglial est clivé et toujours absent après une période de 30 jours.

Afin de s'assurer de l'efficacité de l'inactivation du récepteur, l'expression du GPR120 microglial a été mesurée par qPCR en amont des expériences réalisées (Figure 7).

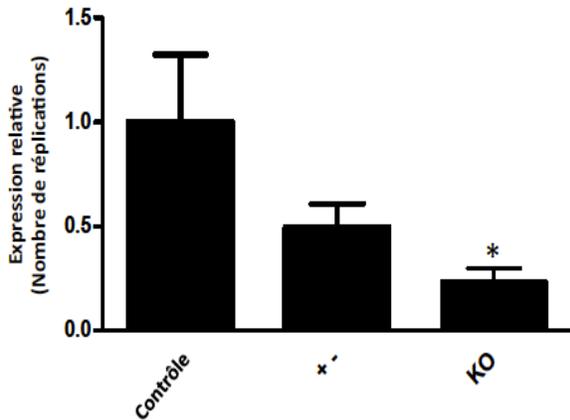


Figure 7. Expression du GPR120 microglial chez les souris $CX_3CR1^{CreER/+}; GPR120^{fl/fl}$. Les valeurs sont normalisées par rapport à l'expression du GPR120 microglial chez les souris contrôles et représentent la moyenne (\pm SEM) de l'expression génique du GPR120 microglial chez les souris hétérozygotes (+/-) et KO, mesurée par qPCR. *p <0,05 vs contrôle.

Les résultats obtenus montrent une réduction significative de l'expression du GPR120 au niveau de la microglie chez les souris KO (p <0,05), bien que cette invalidation ne soit pas totale. Ainsi, les expériences effectuées sur les souris KO au niveau de l'inflammation reflètent l'effet d'une atténuation significative de l'expression du GPR120 microglial.

2.2.6.2 Prélèvement des cellules microgliales à partir de cerveaux de souris

Les différentes étapes et manipulations pour le prélèvement de la microglie mises au point par Roy *et al.* [83] ont été réalisées afin d'évaluer le rôle du GPR120 microglial au niveau de l'inflammation centrale.

Le cerveau de souris $CX_3CR1^{CreER/+}; GPR120^{fl/fl}$ âgées de 1 à 2 jours a été prélevé et transféré dans une boîte de Petri de 100 mm contenant 4-5 ml de milieu de culture (DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's medium*) additionné de 20% de sérum (FBS - *fetal bovine serum*) et de 1% d'ATB (antibiotique) [Penicillin G (10 000 U/ml)-Streptomycin Sulfate (10 000 μ g/ml)].

Une fois les méninges des cerveaux retirées, ceux-ci ont été aspirés successivement et à plusieurs reprises avec deux seringues de calibres différents (22 G et 25 G) jusqu'à l'obtention d'une suspension cellulaire homogène. Les cellules ont par la suite été centrifugées durant 5 minutes à 2 500 RCF et à 4°C. Une fois le surnageant retiré, 5 ml de milieu de culture a été ajouté dans le tube contenant le culot de cellule et mélangé jusqu'à la dissolution de celui-ci. Après avoir filtré

le mélange, la suspension cellulaire a été centrifugée à nouveau durant 5 minutes à 2 500 RCF et à 4°C, et le surnageant a été retiré. Le culot de cellule a ensuite été dissocié dans 5 à 10 ml de milieu de culture (DMEM) additionné de 10% de sérum (FBS) et de 1% d'ATB [Penicillin G (10 000 U/ml)-Streptomycin Sulfate (10 000 µg/ml)].

La suspension cellulaire contenant les divers types de cellules cérébrales a par la suite été placée dans des flasques de 25 ou 75 cm² selon le volume de milieu additionné et incubée à 37°C (95% air / 5% CO₂, 95% humidité) durant 18 à 22 jours. À l'issue de l'incubation, les astrocytes ont atteint 100% de confluence et ont formé une couche. La microglie s'est ensuite développée sur la couche d'astrocytes et s'en est détachée. Durant cette période d'incubation, le milieu de culture de chaque flasque a été changé deux fois par semaine.

Suite à la prolifération des cellules de la microglie, celles-ci ont été isolées des autres cellules en tapant légèrement sur la flasque afin de les détacher des astrocytes et d'en avoir le plus en suspension.

Le milieu de culture contenant la microglie a été aspiré et centrifugé durant 5 minutes à 2 500 RCF et à 4°C. Le surnageant a été retiré et le culot de cellule dissocié dans 3-5 ml de milieu de culture sans FBS. Les cellules microgliales isolées ont été maintenues durant 72h à 37°C (95% air / 5% CO₂, 95% humidité) avant de procéder aux expériences ultérieures et de les ensemercer dans les puits de plaques de culture cellulaire à 12 puits.

Afin d'augmenter l'adhésion de la microglie dans les puits, 1 ml d'un mélange de PBS (*phosphate buffered saline*) et de poly-L-lysine (2 mg de poly-L-lysine pour 50 ml de PBS) a été ajouté dans chaque puits durant 1h. À l'issue de cette étape, le mélange a été retiré et les puits lavés avec de l'eau distillée. 24h avant le début de l'expérience, 1 ml de milieu de culture sans FBS contenant la microglie a été ajouté dans chaque puits afin que celle-ci se pose au fond des puits. Il est primordial pour la réalisation de l'expérience d'avoir un milieu ne contenant pas de sérum afin que ce dernier ne forme pas de complexes avec les molécules ajoutées dans les puits pour activer le GPR120. Ainsi, ces molécules sont libres et disponibles entièrement pour stimuler le GPR120 microglial.

Afin d'avoir une quantité finale d'ARN (acide ribonucléique) suffisante pour la réalisation de la qPCR et la quantification du niveau d'inflammation dans chaque puits, 3 puits ont été incubés au maximum avec des cellules provenant d'un même cerveau de souris. Les expériences *in vitro* ont

été réalisées sur des cellules microgliales provenant de souris WT et de souris $CX_3CR1^{CreER/+};GPR120^{fl/fl}$ dont le KO a été induit suite à une exposition au Tamoxifène. Afin de connaître le génotype des cellules microgliales, un morceau de queue des souris a été pris lors du prélèvement des cerveaux et a été génotypé. Plusieurs génotypes sont possibles pour le gène correspondant au GPR120 à l'issue des croisements de souris réalisés: WT (non flox), hétérozygote (1 séquence flox) ou homozygote (2 séquences flox). De plus, la présence de la Cre a également été testée. Seules les cellules des souris WT (GPR120 WT) et KO (GPR120^{fl/fl} et Cre) ont été retenues pour les expériences.

2.2.6.3 Exposition de la microglie à diverses conditions

24h après que la microglie ait étéensemencée dans chaque puits, le milieu de culture a été aspiré. De plus, 500 μ L de milieu sans FBS ni ATB contenant les molécules de chacune des conditions (éthanol, LPS et CpdA) a été ajouté dans les puits des conditions correspondantes.

Deux expériences séparées ont été menées sur les cellules microgliales prélevées sur les souris WT et KO. Dans un premier temps, le GPR120 a été activé *in vitro* par son agoniste (CpdA) et le niveau d'inflammation a été mesuré chez les cellules WT et KO (n = 12). 72h avant le début des expériences, les puits contenant les cellules KO ont été exposés à 10 nM de Tamoxifène afin d'induire l'invalidation et obtenir des cellules microgliales dont le GPR120 est absent.

Par la suite, les cellules WT et KO ont été soumises à l'une des trois conditions suivantes:

- Condition contrôle: 500 μ L de milieu sans FBS ni ATB contenant de l'éthanol dilué au 100^e durant la totalité de l'expérience (durée totale de l'expérience: 7h).
- Condition inflammatoire (référence pour la comparaison du niveau d'inflammation): 500 μ L de milieu sans FBS ni ATB contenant 100 ng/ml de LPS durant 6h (durée totale de l'expérience: 6h).
- Condition inflammatoire avec stimulation préalable du GPR120: 500 μ L de milieu sans FBS ni ATB contenant 10 μ M de CpdA durant 1h, suivi de 500 μ L de milieu sans FBS ni ATB contenant 100 ng/ml de LPS durant 6h (durée totale de l'expérience: 7h).

À l'issue de la totalité des expériences, du trizol a été ajouté dans chaque puits afin de maintenir l'intégrité de l'ARN des cellules en vue des étapes ultérieures (qPCR et mesure de l'expression

des cytokines). Le milieu de chaque puits a par la suite été recueilli et conservé à -80°C en attendant l'extraction de l'ARN des cellules microgliales et la synthèse de l'ADN complémentaire.

2.2.6.4 Mesure du niveau des cytokines

Le niveau d'inflammation suite à la stimulation du GPR120 a été déterminé de deux manières. L'expression génique de plusieurs cytokines pro-inflammatoires a été mesurée par qPCR.

L'expression protéique a été mesurée par la méthode ELISA [*Enzyme-linked immunosorbent assay*] pour quantifier les taux de cytokines relâchées dans les milieux contenant les cellules.

Afin de procéder à la qPCR, l'ARN des cellules microgliales exposées aux différentes conditions a été extrait au préalable au phénol-chloroforme, suivi de la synthèse de son ADN complémentaire.

La PCR a par la suite été effectuée pour chacune des conditions en triplicata afin de déceler les erreurs potentielles de pipetage pour les diverses cytokines testées (IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α).

Le niveau d'expression génique des cytokines dans les différentes conditions a été comparé à celui obtenu en présence de LPS, choisi comme référence (n = 8). De plus, le gène de référence choisi pour la réalisation de la courbe standard de dilution est le 18S.

La méthode immuno-enzymatique ELISA a par la suite été utilisée pour quantifier les niveaux d'expression protéiques des cytokines inflammatoires présentes dans les milieux des différentes conditions. La mesure quantitative des cytokines s'est faite avec des anticorps qui reconnaissent spécifiquement l'IL-1 β , l'IL-6, le MCP-1 et le TNF- α . Cette méthode de mesure protéique est la plus adéquate dans notre cas, puisque la microglie activée libère les cytokines dans le milieu, et les marqueurs inflammatoires ne sont donc plus présents dans les cellules. C'est la raison pour laquelle nous avons opté pour cette méthode plutôt que pour le Western Blot qui quantifie les protéines présentes dans les cellules après leur extraction de celles-ci.

Les résultats de l'expression génique et protéique des cytokines ont été analysés par rapport à la condition inflammatoire (exposition au LPS durant 6h).

L'interprétation statistique des résultats obtenus s'est faite par ANOVA, suivi du test de comparaison de Bonferroni. De plus, le seuil de signification de 0,05 a été choisi.

2.2.6.5 Étude de la morphologie de la microglie

L'effet du GPR120 microglial sur l'inflammation centrale a été également évalué par l'observation de la morphologie de la microglie. On sait en effet que la polarisation des cellules microgliales change en fonction des conditions et des stimuli environnementaux. Ainsi, les cellules activées (M1) en contexte d'inflammation libèrent des cytokines pro-inflammatoires et deviennent sphériques. Les cellules non activées (M2) en contexte non-inflammatoire se caractérisent par une absence de sécrétion de cytokines inflammatoires et par leurs nombreuses ramifications. Pour évaluer la morphologie de la microglie, plusieurs clichés des cellules ont été pris dans diverses conditions et analysés en aveugle (n = 9). Le nombre de cellules microgliales activées et au repos a été dénombré et la longueur des ramifications a été mesurée en pixel pour chaque cellule en état de surveillance à l'aide du logiciel ImageJ.

3. Résultats

3.1 Effets des acides gras oméga-3 *in vivo*

3.1.1 Impacts au niveau de l'apport alimentaire et du poids des souris

Afin d'évaluer l'effet des acides gras oméga-3 sur le comportement et divers paramètres métaboliques, la moitié de chacun des deux groupes de souris a reçu une supplémentation en oméga-3 à partir de la 8^{ème} semaine de diète. La transition de diète s'est faite de manière isocalorique. Les deux groupes de souris avec supplémentation en acides gras oméga-3 (Ctrl + FO et HFD + FO) ont ainsi reçu la même quantité de calories que leurs diètes respectives précédentes (Ctrl et HFD), soit durant les 8 premières semaines.

Cela se traduit d'ailleurs par un apport cumulatif alimentaire moyen qui est comparable ($p > 0,05$) entre les groupes avec oméga-3 et leurs anciens groupes respectifs (Ctrl vs Ctrl + FO et HFD vs HFD + FO) (Figure 8A). Il en est de même au niveau de l'apport énergétique cumulatif moyen qui n'est pas statistiquement différent entre les groupes avec oméga-3 et leurs anciens groupes ($p > 0,05$ pour Ctrl vs Ctrl + FO et HFD vs HFD + FO) (Figure 8B).

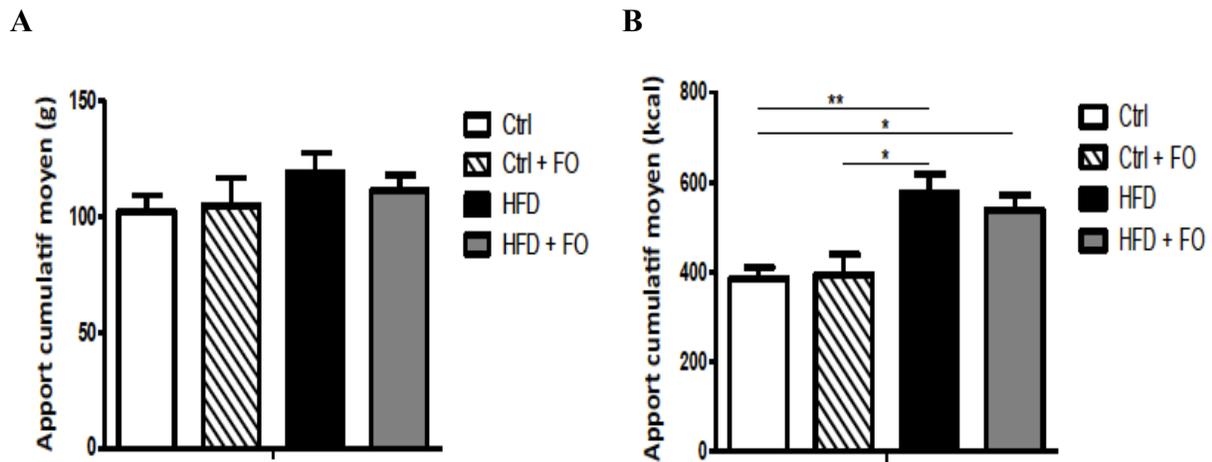


Figure 8. Apports alimentaires et énergétiques cumulatifs moyens (semaines 8 à 14). Les valeurs en gramme représentent la moyenne cumulative de l'apport alimentaire (\pm SEM) des quatre groupes de souris entre les semaines 8 et 14 (A). Les valeurs en kilocalories représentent la moyenne cumulative de l'apport énergétique (\pm SEM) des quatre groupes de souris entre les semaines 8 et 14 (B).

Apport énergétique diètes Ctrl et Ctrl + FO: 376 kcal / 100 g.

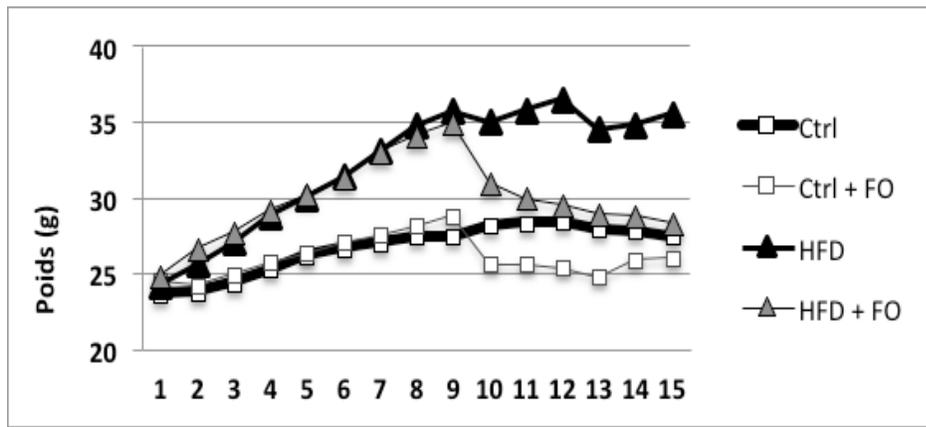
Apport énergétique HFD et HFD + FO: 483,9 kcal / 100 g.

(n [Ctrl] = 10, n [Ctrl+ FO] = 4 + 6 décès, n [HFD] = 10, n [HFD + FO] = 8 + 2 décès). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Au niveau du poids des souris, l'introduction des acides gras oméga-3 à la 8^{ème} semaine a induit une perte significative de poids dans les groupes Ctrl + FO et HFD + FO (Figure 9A). Le poids de ces groupes s'est par la suite stabilisé à partir de la 12^{ème} semaine jusqu'à la fin de la diète

(Figure 9A). À l'issue des 14 semaines de diète, le poids moyen du groupe HFD était significativement plus élevé que celui du groupe Ctrl tel qu'attendu ($p < 0,001$), étant donné que leur apport énergétique était supérieur (Figure 9B). Aucune différence significative de poids n'a été observée suite à l'administration d'oméga-3 au groupe Ctrl ($p > 0,05$ entre Ctrl et Ctrl + FO) (Figure 9B). Cependant, les oméga-3 ont eu un effet significatif au niveau du poids des souris du groupe HFD ($p < 0,001$ entre HFD et HFD + FO), malgré des apports alimentaires et énergétiques similaires (Figure 9B).

A



B

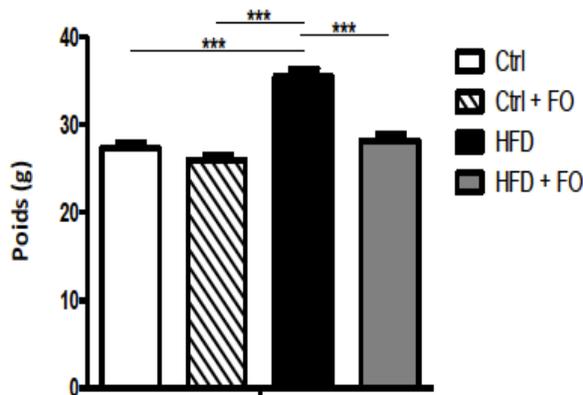


Figure 9. Poids moyen des souris au cours de la diète. Les valeurs en gramme représentent l'évolution moyenne du poids des quatre groupes de souris durant les 14 semaines de diète (A). Les valeurs en gramme représentent le poids final moyen (\pm SEM) des quatre groupes de souris à la semaine 14 (B).

(n [Ctrl] = 10, n [Ctrl+ FO] = 4 + 6 décès, n [HFD] = 10, n [HFD + FO] = 8 + 2 décès). *** $p < 0,001$.

Les acides gras oméga-3 ont « protégé » les souris du groupe HFD en ralentissant la prise de poids, même si les apports énergétiques étaient comparables entre les groupes HFD et HFD + FO

($p > 0,05$) (Figure 8B). La supplémentation en acides gras oméga-3 a donc eu un impact sur la dépense énergétique au niveau de la balance énergétique. L'efficacité énergétique qui représente le gain de poids moyen pour 100 kcal ingérées est en effet significativement moindre en présence d'oméga-3 ($p < 0,001$ entre Ctrl et Ctrl + FO et entre HFD et HFD + FO) (Figure 10).

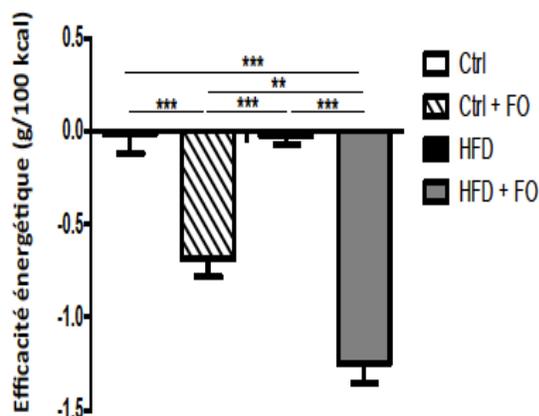


Figure 10. Efficacité énergétique moyenne des 4 groupes de souris. Les valeurs en gramme/100 kilocalories représentent le gain de poids moyen en gramme (\pm SEM) pour l'ingestion de 100 kcal des quatre groupes de souris à l'issue de 14 semaines de diète.

(n [Ctrl] = 10, n [Ctrl+ FO] = 4 + 6 décès, n [HFD] = 10, n [HFD + FO] = 8 + 2 décès). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Les acides gras de type oméga-3 ont donc eu un impact métabolique significatif et ont permis une meilleure gestion énergétique de la nourriture.

3.1.2 Impacts au niveau du métabolisme

3.1.2.1 Amélioration du glucose sanguin

À l'issue des 14 semaines de diète, la glycémie de trois groupes de souris a été mesurée afin de vérifier l'effet de l'alimentation sur l'homéostasie glucidique. Le groupe Ctrl + FO a été exclu des analyses puisque les souris de ce groupe ont eu diverses complications au cours des 14 semaines (anémie, saignements, hypovolémie etc.) et leur état n'était probablement pas représentatif de l'effet réel de la diète sur la glycémie. Ceci peut être dû au fait que les oméga-3, lorsque administrés en grande quantité dans le cadre d'une diète contrôle, peuvent perturber le bon fonctionnement immunitaire des souris et augmenter leurs risques d'infections, de maladies et de mortalité [84]. De plus, un excès d'oméga-3 peut augmenter les saignements et les perturbations gastro-intestinales [84].

Les acides gras oméga-3 ont significativement réduit la glycémie des souris du groupe HFD ($p < 0,05$) (Figure 11). La glycémie du groupe HFD + FO ($9,5 \pm 0,2$) est ainsi inférieure à celle du groupe HFD ayant reçu une diète pro-inflammatoire riche en huile de palme ($11,3 \pm 0,4$) (Figure 11).

Les acides gras oméga-3 ont donc eu un impact positif sur l'homéostasie du glucose des souris en inflammation chronique induite par la diète. L'effet réversible observé dans notre expérience laisse supposer qu'une supplémentation en oméga-3 pourrait constituer un traitement potentiel efficace contre le diabète chez les personnes obèses en présence d'une inflammation chronique (impact de la diète nord-américaine riche en acide gras saturés). D'autre part, il est intéressant de noter que la glycémie moyenne du groupe HFD + FO ($9,5 \pm 0,2$) se rapproche de celle du groupe Ctrl ($10,1 \pm 0,6$) (Figure 11). Le glucose sanguin de ces deux groupes est comparable et la différence n'est pas significative ($p > 0,05$).

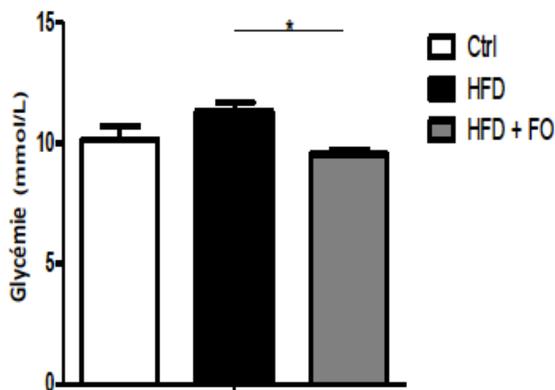


Figure 11. Glycémie à l'issue des 14 semaines de diète. Les valeurs représentent la glycémie moyenne en mmol/L (\pm SEM) des trois groupes de souris, 14 semaines après le début des diètes. (n [Ctrl] = 10, n [HFD] = 10, n [HFD + FO] = 8 + 2 décès). * $p < 0,05$.

3.1.2.2 Amélioration du profil lipidique

À la fin des 14 semaines de diète, le type d'acides gras en circulation a été mesuré chez les groupes de souris à l'exclusion du groupe Ctrl + FO à cause du mauvais état des ses souris (Figure 12). La supplémentation en acides gras oméga-3 a modifié le profil des acides gras de manière bénéfique. La supplémentation a en effet réduit les oméga-6 au profit des oméga-3 (Figures 12D, 12E et 12F).

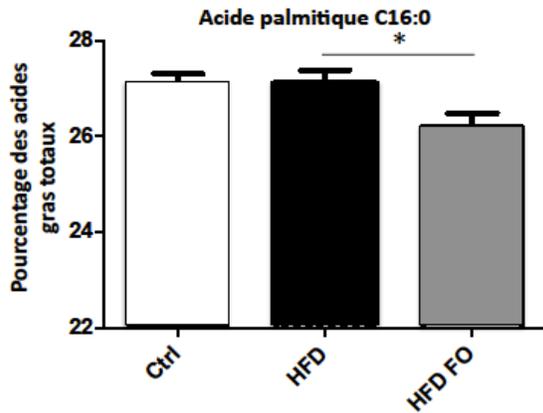
Ces changements sont significatifs lors d'une inflammation chronique, lorsque l'on passe de la diète riche en gras saturés (HFD) à la diète riche en oméga-3 (HFD + FO). Les niveaux circulants

d'acide palmitique (C16:0) ont ainsi été réduits significativement par les oméga-3 chez les souris en présence d'une inflammation chronique induite par la diète ($p < 0,05$ entre les groupes HFD + FO et HFD) (Figure 12A). Il en est de même pour l'acide arachidonique (C20:4 n-6) et pour le pourcentage total d'acides gras saturés et d'oméga-6 ($p < 0,01$, $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement entre les groupes HFD + FO et HFD) (Figures 12B, 12C et 12D).

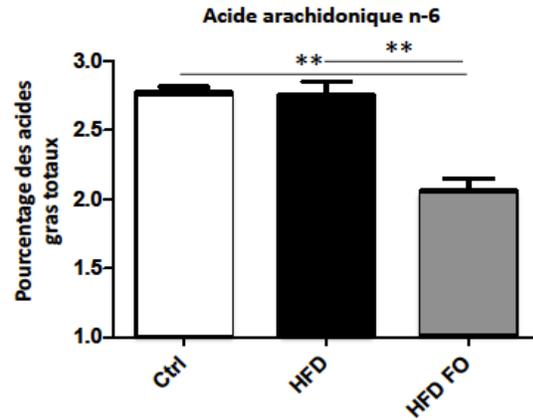
Concernant les niveaux circulants d'oméga-3, on observe une augmentation du taux de DHA à l'issue de la supplémentation sans toutefois que celle-ci ne soit significative ($p > 0,05$ entre les groupes HFD + FO et HFD) (Figure 12F). Le taux d'EPA en circulation a quant à lui été augmenté significativement suite à la supplémentation en oméga-3 ($p < 0,01$ entre les groupes HFD + FO et HFD) (Figure 12E).

La supplémentation en acides gras oméga-3 améliore ainsi le profil des acides gras en circulation en réduisant les niveaux d'oméga-6 pro-inflammatoires au profit des oméga-3 anti-inflammatoires (Figure 12).

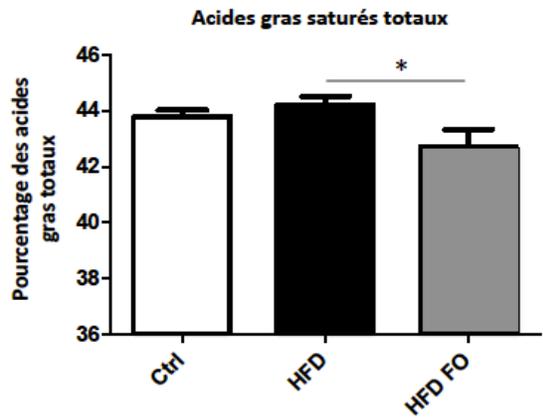
A



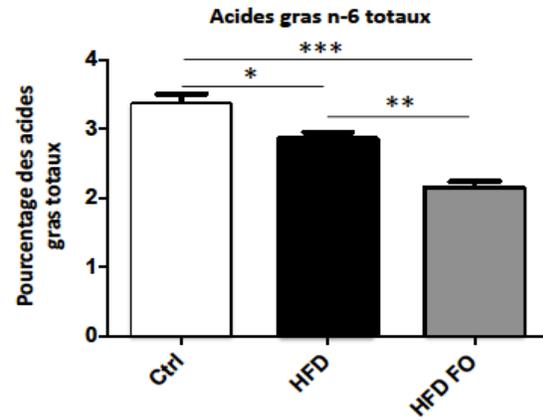
B



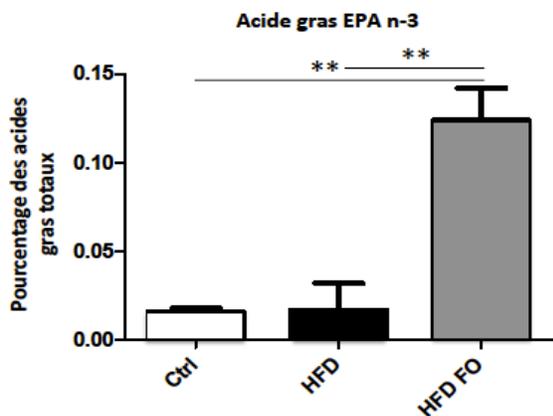
C



D



E



F

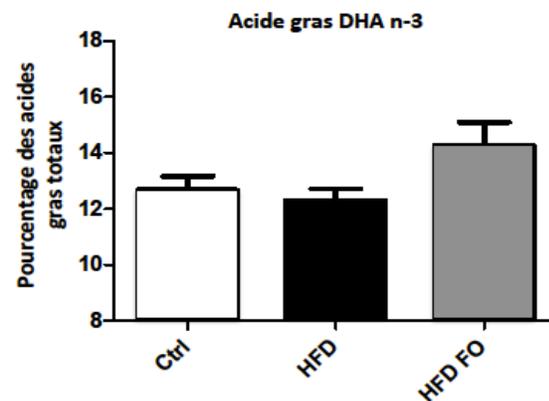


Figure 12. Pourcentage des lipides sanguins à l'issue des 14 semaines de diète. Les valeurs représentent le pourcentage moyen (\pm SEM) de différents types d'acides gras en circulation chez les trois groupes de souris à l'issue des 14 semaines de diètes. (n [Ctrl] = 10, n [HFD] = 10, n [HFD + FO] = 8 + 2 décès).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.1.3 Impacts au niveau du comportement

La supplémentation en acides gras oméga-3 a également eu un impact au niveau du comportement des souris. Les signes reliés à l'anxiété ont été mesurés par le biais de deux tests (EPM et OFT) et ceux reliés à la dépression par un seul test (FST).

3.1.3.1 EPM ou labyrinthe en croix surélevée

Les résultats obtenus lors de l'EPM montrent une différence significative au niveau de la distance parcourue par le groupe Ctrl + FO et les deux groupes Ctrl ($p < 0,01$) et HFD ($p < 0,05$) (Figure 13A). L'hypo-motilité du groupe Ctrl + FO par rapport aux autres groupes est reliée à leur état de santé et multiples complications dont les souris ont été victimes durant plusieurs semaines. Elles ont en effet été anémiques (doigts blancs, foie, reins et autres tissus pâles etc.) et déshydratées (signes d'hypovolémie) d'après les techniciens et vétérinaires du centre de recherche. Elles ont de plus perdu du poids et ont été sujettes à des saignements cutanés et intestinaux. Étant donné leur état de santé non propice aux tests de comportement, on peut supposer que les résultats du groupe Ctrl + FO ne sont pas fiables et ne sont pas représentatifs de l'effet réel des acides gras oméga-3 sur le comportement.

Concernant les trois autres groupes (Ctrl, HFD et HFD + FO), il n'y a pas de différences significatives au niveau de leur locomotion ($p > 0,05$) (Figure 13A). Les effets observés au niveau du comportement sont ainsi attribuables à l'unique action de la diète.

Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative au niveau du comportement relié à l'anxiété entre les souris Ctrl et HFD, puisque le temps passé dans les bras ouverts est comparable entre ces groupes ($p > 0,05$) (Figure 13B). Il en est de même pour le temps passé dans les bras fermés qui est comparable entre ces deux groupes ($p > 0,05$) (Figure 13D). Ceci va à l'encontre de la théorie qui associe le comportement anxio-dépressif à l'inflammation induite par la diète riche en gras saturés [18].

Les acides gras oméga-3 n'ont quant à eux eu aucun effet significatif sur l'anxiété, malgré une tendance vers la hausse de l'anxiété des souris ($p > 0,05$ entre les groupes HFD et HFD + FO, Figures 13B, 13C, 13D).

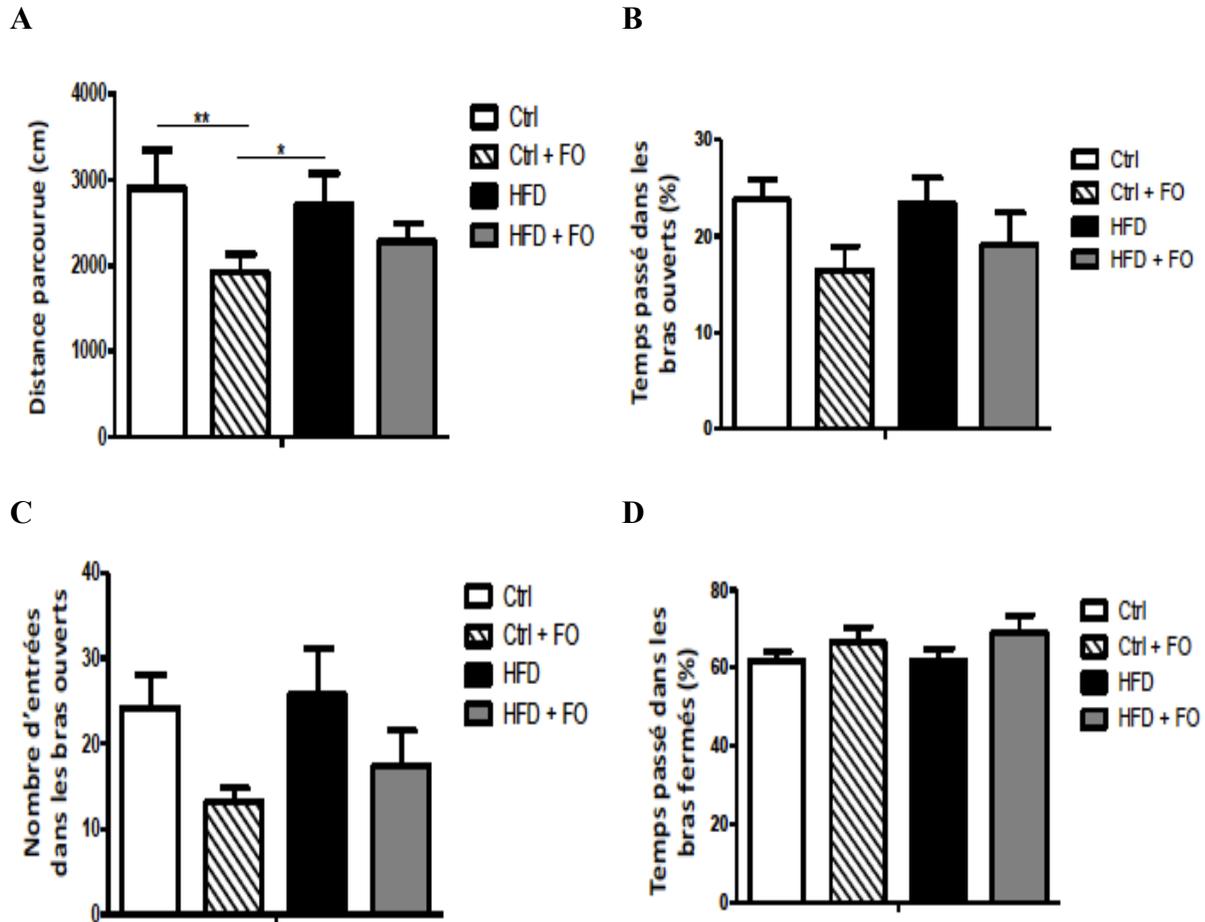


Figure 13. Résultats du test du labyrinthe en croix surélevée à l'issue des 14 semaines de diète. Les valeurs représentent la distance moyenne parcourue en centimètres (\pm SEM) par les quatre groupes de souris (A), le temps moyen en pourcentage (\pm SEM) passé dans les bras ouverts (B) et fermés (D) au cours des 5 minutes du test, ainsi que le nombre moyen d'entrées (\pm SEM) dans les bras ouverts (C) lors de l'EPM. (n [Ctrl] = 10, n [Ctrl+ FO] = 6 + 1 *outlier* + 3 décès, n [HFD] = 10, n [HFD + FO] = 8 + 2 décès). *p < 0,05, **p < 0,01.

En se basant sur ces résultats obtenus dans le cadre de l'EPM, on peut dire que les acides gras oméga-3 n'ont pas eu d'effets significatifs sur l'anxiété des souris.

3.1.3.2 OFT ou test de champ ouvert

Les résultats obtenus lors de l'OFT montrent une différence significative de la locomotion entre tous les groupes ($p < 0,01$ ou $0,001$) sauf entre les groupes HFD et HFD + FO ($p > 0,05$) (Figure 14A). Ces différences statistiques signifient que la diète a pu avoir un effet sur l'anxiété et sur la

locomotion. Il est ainsi plus difficile d'interpréter ces résultats et d'évaluer l'effet réel de la diète dans le comportement des souris dans le cadre de ce test.

On note toutefois une tendance à la baisse du temps passé au centre de la boîte dans le groupe HFD par rapport au groupe Ctrl (Figure 14B). Cela démontre un effet anxiogène induit par les acides gras saturés pro-inflammatoires de la diète HFD. Il faut cependant faire preuve de retenue dans notre interprétation en raison de la différence de locomotion entre ces deux groupes ($p < 0,01$) (Figure 14A).

Concernant le groupe Ctrl + FO, la locomotion de ses souris est significativement moindre que celle des autres groupes ($p < 0,01$ avec le groupe HFD + FO et $p < 0,001$ avec les groupes Ctrl et HFD) (Figure 14A). L'hypo-motilité observée est explicable par l'état de santé fragile de ces souris suite à de multiples complications (saignements, anémie etc.). Ainsi, le peu de temps passé au centre de la boîte par les souris est plus imputable à un manque de mobilité qu'à un état d'anxiété induit par la diète (Figure 14B). Les résultats de ce groupe sont donc plus difficiles à interpréter.

Les résultats des groupes HFD et HFD + FO peuvent être comparés ensemble puisqu'ils sont attribuables à l'unique action de la diète. Il n'y a en effet pas de différence significative de locomotion entre ces deux groupes ($p > 0,05$) (Figure 14A).

Les acides gras oméga-3 n'ont eu aucun effet significatif sur l'anxiété, malgré une tendance vers la baisse de l'anxiété des souris HFD + FO par rapport au groupe HFD ($p > 0,05$ Figures 14B et 14D).

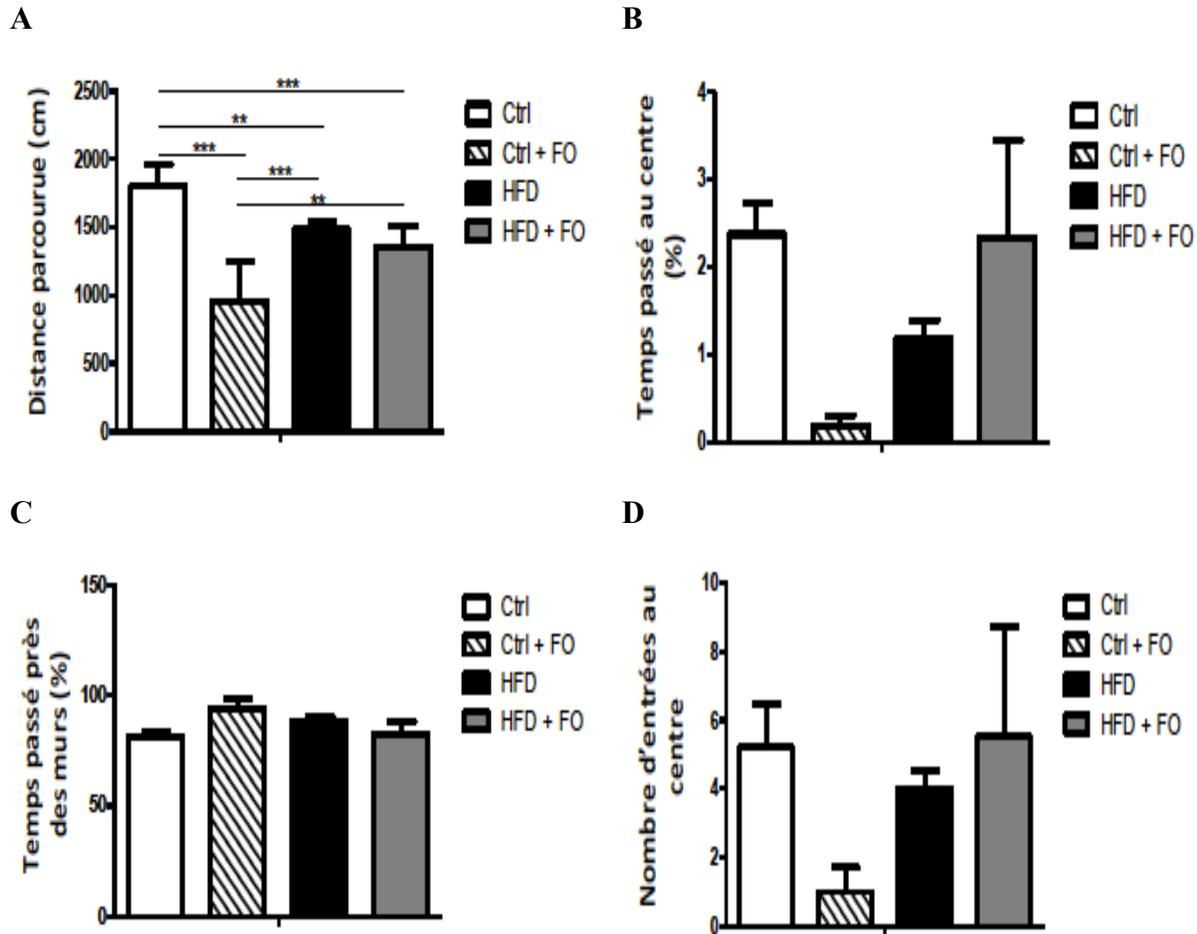


Figure 14. Résultats du test de champ ouvert à l'issue des 14 semaines de diète. Les valeurs représentent la distance moyenne parcourue en centimètres (\pm SEM) par les quatre groupes de souris (A), le temps moyen en pourcentage (\pm SEM) passé au centre (B) et près des murs (C) au cours des 5 minutes du test, ainsi que le nombre moyen d'entrées (\pm SEM) au centre (D) lors de l'OFT.

(n [Ctrl] = 9 + 1 *outlier*, n [Ctrl+ FO] = 4 + 1 *outlier* + 5 décès, n [HFD] = 10, n [HFD + FO] = 8 + 2 décès).

p <0,01, *p <0,001.

En se basant sur ces résultats obtenus dans le cadre de l'OFT, on peut dire que les acides gras oméga-3 n'ont pas d'effets significatifs sur l'anxiété des souris.

3.1.3.3 FST ou test de nage forcée

Le test de nage forcée a été effectué en deux journées sur l'ensemble des souris, tout comme les deux autres tests (EPM et OFT). Afin de réduire les variables confondantes entre ces deux journées, les mêmes conditions ont été reproduites (ordre de passage des groupes de souris, pas de bruits ambiants etc.). Cependant, dû à des imprévus techniques, le test n'a pas pu être débuté à la même heure lors des deux jours de test. Il a en effet été entamé le premier jour avec une heure

de retard à 9h et le deuxième jour à l'heure prévue à 8h. Le test s'est ainsi terminé le premier jour après 10h, heure à laquelle le cycle des souris change, sans toutefois que les lumières ne s'éteignent dans la pièce où se déroule le FST. Ce décalage d'une heure entre les deux journées de test s'est traduit par des différences considérables au niveau des paramètres mesurés, particulièrement au niveau de l'immobilité des souris du jour 1 et de celles du jour 2. Afin de pouvoir comparer entre elles les valeurs obtenues, elles ont été normalisées par rapport au groupe Ctrl et un ratio a été effectué afin de procéder à l'analyse.

Les résultats montrent que les acides gras oméga-3 réduisent significativement le temps d'immobilité dans le groupe HFD + FO par rapport au groupe HFD, donc le comportement dépressif ($p < 0,01$) (Figures 15A et 15C).

Même si les résultats pour les autres groupes ne sont pas significatifs ($p > 0,05$), on note cependant une tendance qui va dans le sens de l'association entre l'inflammation et la dépression. L'immobilité du groupe HFD ayant reçu des acides gras saturés pro-inflammatoires est en effet supérieure à celle du groupe Ctrl ($p > 0,05$ Figures 15A et 15C). Concernant le groupe Ctrl + FO supplémenté en huile de poisson oméga-3, aucune conclusion ne peut être émise car l'état de santé des souris n'était pas optimal lors du test et les résultats ne sont donc pas fiables pour ce groupe.

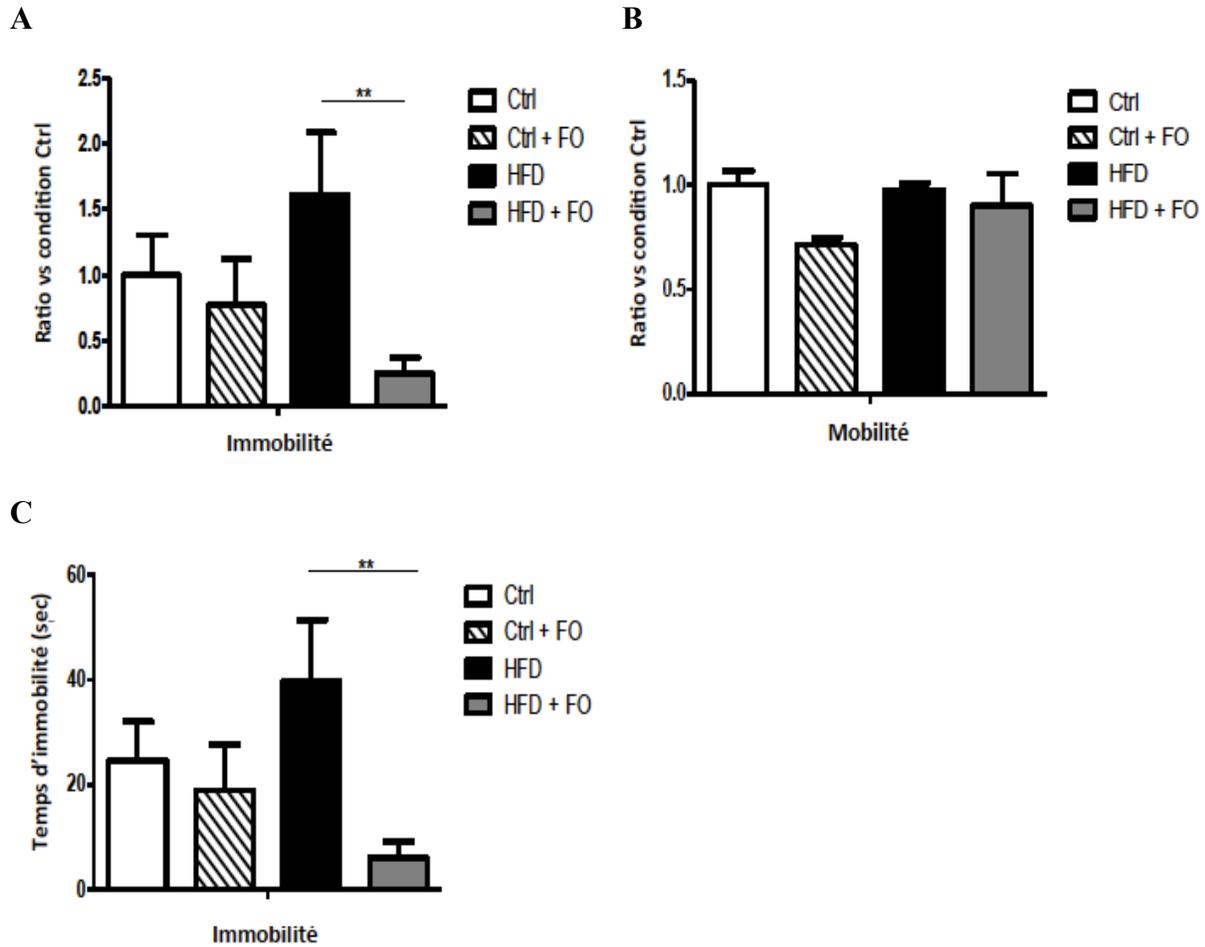


Figure 15. Résultats du test de nage forcée à l'issue des 14 semaines de diète. Les valeurs représentent les temps moyens (\pm SEM) d'immobilité (A) et de mobilité (B) des quatre groupes de souris normalisés par rapport au groupe Ctrl, ainsi que le temps moyen (\pm SEM) d'immobilité en secondes des groupes au cours des 4 minutes de FST. (n [Ctrl] = 10, n [Ctrl+ FO] = 5 + 5 décès, n [HFD] = 10, n [HFD + FO] = 7 + 1 *outlier* + 2 décès). **p < 0,01.

Les acides gras oméga-3 ont ainsi la capacité de réduire le comportement relié à la dépression chez les souris, et cette baisse est significative dans un contexte d'inflammation chronique (suite à une diète prolongée en acides gras saturés).

3.2 Stimulation du GPR120 microglial *in vitro*

3.2.1 Réduction du niveau de cytokines par le CpdA

Dans le cadre de cette expérience, l'effet de l'activation du GPR120 microglial en contexte d'inflammation aiguë a été mesuré. Les cellules microgliales primaires de deux types de souris (WT et $CX_3CR1^{CreER/+};GPR120^{fl/fl}$) ont été mises en contact avec le CpdA, un agoniste

synthétique du GPR120. Ces cellules ont été exposées au préalable au LPS afin d'induire un état d'inflammation.

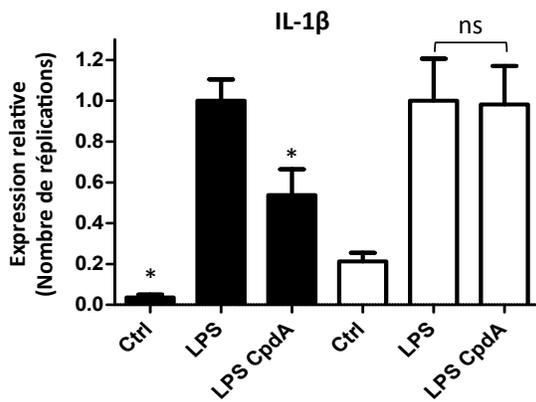
Les niveaux d'inflammation ont par la suite été mesurés par l'expression génique (Figure 16) et protéique (Figure 17) de quatre cytokines (IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α).

Les mesures de l'inflammation ont été comparées à ceux obtenus en présence de LPS qui est la condition inflammatoire choisie comme référence.

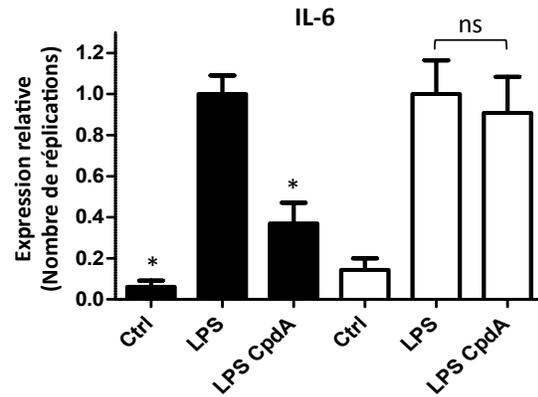
Les résultats obtenus montrent que la stimulation du GPR120 microglial dans les cellules WT en contexte d'inflammation réduit significativement les niveaux inflammatoires. On observe en effet une réduction significative de l'expression génique de l'IL-1 β , de l'IL-6, du MCP-1 et du TNF- α ($p < 0,05$ entre les conditions LPS + CpdA et LPS) (Figures 16A, 16B, 16C, 16D).

L'implication du GPR120 dans la réduction de la neuro-inflammation est confirmée également par les résultats obtenus avec les cellules KO. Ainsi, l'expression génique des cytokines en présence de CpdA est comparable à celle obtenue en présence de LPS inflammatoire ($p > 0,05$ entre les conditions LPS + CpdA vs LPS) (Figure 16). Il n'y a donc aucune différence d'inflammation en l'absence du GPR120 et l'effet anti-inflammatoire n'est plus présent. Cela démontre que le GPR120 microglial est indispensable à la réduction de l'inflammation centrale.

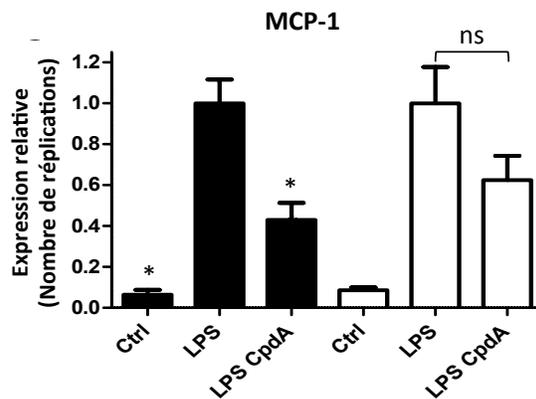
A



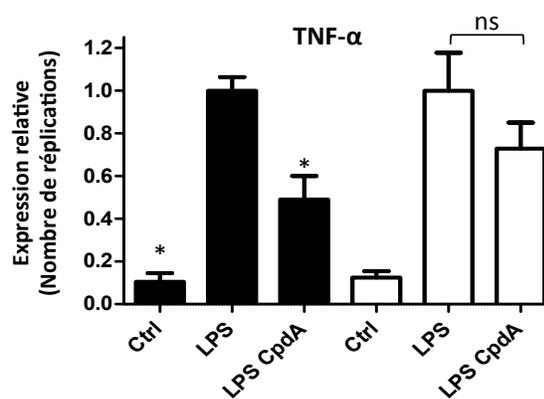
B



C



D



■ WT
□ KO

Figure 16. Effet du CpdA sur l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires. Les valeurs obtenues par qPCR sont normalisées par rapport à la condition LPS et représentent la moyenne (\pm SEM) de l'expression génique de l'IL-1 β (A), l'IL-6 (B), le MCP-1 (C) et le TNF- α (D) suite à la stimulation du GPR120 microglial par le CpdA en contexte inflammatoire (exposition préalable au LPS durant 6h) dans les cellules WT et KO (n = 12).

*p < 0,05 vs LPS.

Les observations de l'expression génique sont corroborées par les résultats de l'expression protéique des cytokines testées. Les taux de cytokines relâchées dans le milieu sont ainsi abaissés en présence de CpdA. En effet, la stimulation du GPR120 chez les cellules WT en contexte inflammatoire entraîne une baisse significative de la production d'IL-6, de MCP-1 et de TNF- α (p < 0,05 entre les conditions LPS + CpdA et LPS) (Figures 17B, 17C et 17D). Concernant l'IL-1 β , on observe une réduction des niveaux relâchés dans le milieu sans toutefois que cette baisse ne soit significative (p > 0,05 entre les conditions LPS + CpdA et LPS) (Figure 17A).

Le rôle anti-inflammatoire du GPR120 est également démontré par les résultats obtenus chez les cellules KO. Les niveaux de cytokines présents dans le milieu sont ainsi comparables en l'absence de GPR120 ($p > 0,05$ entre les conditions LPS + CpdA et LPS, Figure 17).

Ces données démontrent que la réduction de l'inflammation passe par le GPR120 dont la présence est nécessaire.

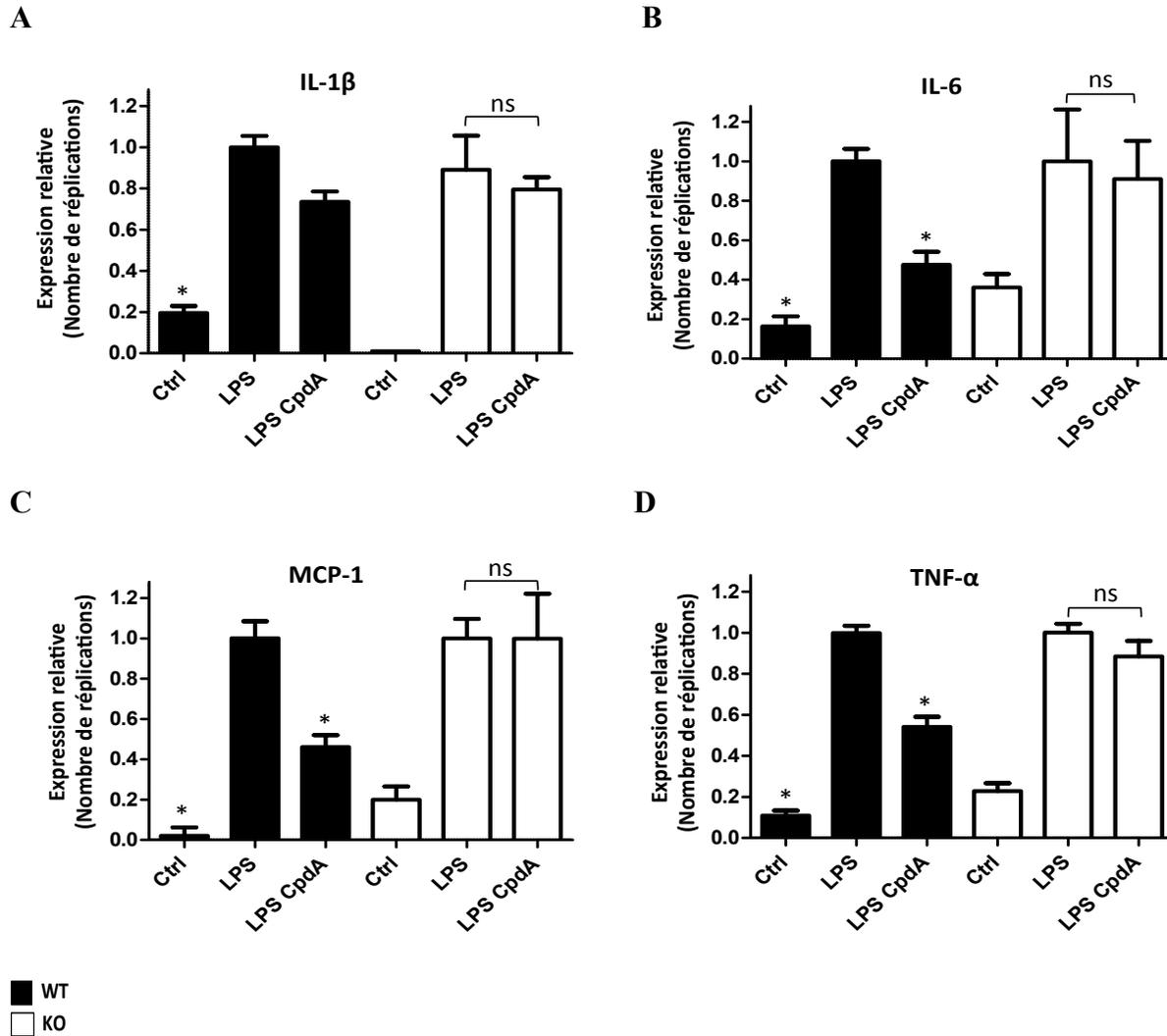


Figure 17. Effet du CpdA sur l'expression protéique des cytokines pro-inflammatoires. Les valeurs obtenues par ELISA sont normalisées par rapport à la condition LPS et représentent la moyenne (\pm SEM) de l'expression protéique de l'IL-1 β (A), l'IL-6 (B), le MCP-1 (C) et le TNF- α (D) suite à la stimulation du GPR120 microglial par le CpdA en contexte inflammatoire (exposition préalable au LPS durant 6h) dans les cellules WT et KO ($n = 12$). * $p < 0,05$ vs LPS.

Ainsi, les résultats obtenus confortent l'idée que le GPR120 microglial est impliqué dans la réduction de l'inflammation en contexte d'inflammation aiguë. Ceci se traduit non seulement par

la réduction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, mais également par le changement de la polarisation des cellules de la microglie.

3.2.2 Réduction de la forme active des cellules microgliales

La morphologie et l'aspect de la microglie diffèrent selon les conditions auxquelles elle est soumise. En contexte inflammatoire, les cellules microgliales sont activées (phénotype M1) et sont reconnaissables à leur forme sphérique et la disparition de leurs ramifications.

En contexte non-inflammatoire, les cellules de la microglie sont au repos (phénotype M2) et sont reconnaissables à leurs prolongements qui forment un réseau de surveillance.

Les résultats précédents montrent que la stimulation du GPR120 réduit significativement l'expression de diverses cytokines inflammatoires et donc l'inflammation centrale (Figures 16 et 17). L'activation du GPR120 se traduit également par une modification de la morphologie des cellules de la microglie en contexte d'inflammation aiguë (Figure 18).

Le GPR120 a été activé dans cette expérience par le CpdA et par les oméga-3 (EPA et DHA). Le phénotype des cellules a été comparé à celui obtenu en présence de LPS qui est la condition inflammatoire choisie comme référence.

Les résultats obtenus montrent que la stimulation du GPR120 par le CpdA et le DHA réduit significativement le nombre de cellules actives de phénotype M1 ($p < 0,05$ entre les conditions LPS + CpdA et LPS, et entre les conditions LPS + DHA et LPS) (Figure 18A).

Le GPR120 augmente par ailleurs le nombre de cellules non actives de phénotype M2 ($p < 0,05$ entre les conditions LPS + CpdA et LPS, et entre les conditions LPS + DHA et LPS) (Figure 18B). La même tendance est observée également en présence d'EPA sans toutefois que celle-ci ne soit statistiquement significative ($p > 0,05$ entre les conditions LPS + EPA et LPS).

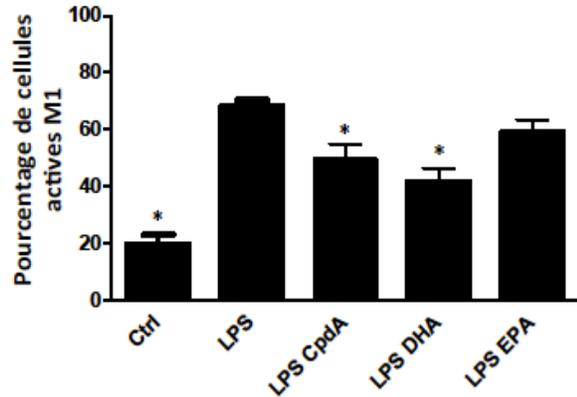
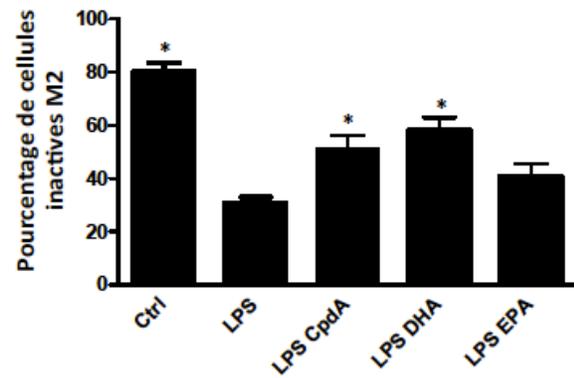
A**B**

Figure 18. Effet de la stimulation du GPR120 sur la morphologie de la microglie. Les valeurs représentent le pourcentage moyen (\pm SEM) des cellules microgliales actives (A) et au repos (B) suite à la stimulation du GPR120 microglial par le CpdA et les oméga-3 en contexte inflammatoire (exposition préalable au LPS durant 6h) dans les cellules WT (n = 9). *p < 0,05.

Ces résultats montrent que la microglie peut changer de polarisation et de phénotype dépendamment des stimuli environnementaux. Le GPR120 microglial a donc le potentiel de réduire significativement le niveau d'inflammation et de réduire l'activation de la microglie.

4. Discussion

Les rôles du GPR120 au niveau de l'inflammation centrale et du comportement sont de plus en plus étudiés et le nombre d'études qui se penchent sur ces aspects est croissant. Il en est de même pour les acides gras oméga-3 anti-inflammatoires qui font partie des agonistes du GPR120. Ce récepteur possède des propriétés bénéfiques et un potentiel intéressant à exploiter pour mettre au point un traitement qui agirait à plusieurs niveaux dans l'organisme.

Diverses conditions qui sont croissantes dans notre société ont une étiologie inflammatoire et/ou sont reliées à un état d'inflammation chronique (dépression, diabète, obésité etc.). Pour faire face à ces pathologies, le GPR120 et ses agonistes aux effets anti-inflammatoires peuvent faire partie de la solution.

Plusieurs expériences ont été menées dans notre recherche et dans la littérature pour mieux caractériser l'effet du GPR120 et des acides gras oméga-3 sur des aspects inter-reliés dans l'organisme (inflammation centrale, métabolisme et comportement anxio-dépressif).

4.1 Interprétation des résultats *in vivo*

4.1.1 Glucose sanguin

Les expériences menées *in vivo* sur les souris montrent que les acides gras oméga-3 peuvent modifier positivement certains paramètres métaboliques en contexte d'inflammation chronique induite par la diète. On observe ainsi une amélioration significative du glucose sanguin par la supplémentation en oméga-3 suite à une diète riche en gras ($p < 0,05$ entre les groupes HFD + FO et HFD) (Figure 11). Plus intéressant encore, il semblerait que les oméga-3 ont un effet potentiellement réversible sur la glycémie puisqu'elle est comparable chez les groupes HFD + FO et Ctrl ($p > 0,05$) (Figure 11). Les acides gras oméga-3 ont donc rétabli l'homéostasie glucidique en ramenant la glycémie dans les valeurs normales.

Les résultats de nos expériences *in vivo* sont similaires aux conclusions de diverses études. Ces études démontrent par exemple que les acides gras oméga-3 sont corrélés à la sensibilité à l'insuline [31], améliorent la glycémie [25] et ont un effet réversible sur celle-ci en la ramenant à un niveau normal en contexte d'inflammation chronique induite par la diète [26] [32]. Ces impacts métaboliques sont dus à plusieurs mécanismes dont l'activation du PPAR- γ et la phosphorylation de l'Akt qui permet la transduction du signal au niveau cellulaire et l'entrée du glucose dans les myocytes [32].

Même si les acides gras de type oméga-3 font partie des agonistes du GPR120 et peuvent l'activer, il est difficile d'affirmer avec certitude que les effets glycémiques observés *in vivo* passent exclusivement par ce récepteur. Les recherches futures devraient se pencher davantage sur la question des autres voies et récepteurs qui sont possiblement activés par les acides gras oméga-3 *in vivo* en plus du GPR120 et qui pourraient expliquer l'amélioration de la sensibilité à l'insuline suite à la supplémentation. Plusieurs études démontrent que le GPR120 est activé par les acides gras oméga-3 et qu'il est responsable de l'amélioration de la glycémie et de la sensibilité à l'insuline. Cependant, il est difficile d'affirmer que c'est l'action unique du GPR120 qui est à la source de ces changements métaboliques. Une diète riche en CpdA améliore ainsi chez les souris WT plusieurs paramètres métaboliques en lien avec la glycémie (tolérance au glucose et à l'insuline, réduction de la sécrétion d'insuline donc augmentation de la sensibilité à celle-ci) [25]. Les mêmes améliorations sont obtenues lorsque l'expérience est reproduite avec une diète riche en oméga-3 [25]. Il est intéressant de noter qu'aucun changement métabolique et/ou glycémique n'est constaté en l'absence du GPR120 chez les souris GPR120 KO, quelle que soit la nature de la diète administrée (CpdA et oméga-3) [25]. Ceci renforce l'idée que la présence du GPR120 est indispensable pour promouvoir les effets bénéfiques des oméga-3 *in vivo* sur la glycémie et que ceux-ci passent par l'activation du récepteur.

L'amélioration de la sensibilité à l'insuline de l'organisme par les acides gras oméga-3 se fait par l'intermédiaire du GPR120 et cet effet serait de nature indirecte [26]. C'est suite à l'action anti-inflammatoire du GPR120 que la sensibilité à l'insuline est améliorée à l'issue d'une supplémentation en oméga-3 [26]. On sait en effet que la présence d'inflammation chronique est associée à une résistance à l'insuline plus élevée dans le cadre de l'obésité notamment [7].

Il a d'ailleurs été confirmé que le potentiel anti-inflammatoire des acides gras oméga-3 passe par le GPR120, en réduisant particulièrement l'expression du COX-2 (*cyclooxygenase-2*). Cette enzyme catalyse une réaction avec l'acide arachidonique et conduit à la formation de prostaglandines aux propriétés pro-inflammatoires [85]. En réduisant le COX-2 et les niveaux d'inflammation par l'activation du GPR120, les oméga-3 agissent donc indirectement sur la glycémie.

Au niveau des cellules musculaires, la stimulation *in vivo* du GPR120 par une diète riche en CpdA chez des souris WT améliore la sensibilité et la réponse à l'insuline. Ceci se traduit par une augmentation de l'entrée du glucose dans les myocytes suite à l'injection d'insuline [25]. De

plus, la diète riche en CpdA augmente la phosphorylation de l'Akt, donc l'activation de la voie cellulaire qui permet l'entrée du glucose dans les cellules [25]. De plus, le CpdA augmente le taux de perfusion de glucose (GIR) chez les souris WT ce qui montre une amélioration de la sensibilité à l'insuline dans tout l'organisme et spécifiquement au niveau des muscles [25].

Cet effet n'est par ailleurs constaté qu'en présence de GPR120 chez les souris WT.

Les mêmes effets sont observés lors d'une diète riche en oméga-3. L'amélioration glycémique des acides gras oméga-3 est induite par le GPR120 au niveau musculaire qui augmente l'entrée du glucose dans les myocytes. Une diète contenant 2% de DHA augmente ainsi l'expression génique du GPR120 musculaire qui médie les effets des oméga-3 [32]. Il semblerait d'ailleurs que l'effet du DHA passe exclusivement par le GPR120 puisque aucun changement de transcription n'est observé pour d'autres marqueurs/récepteurs impliqués dans les voies métaboliques cellulaires, tel que le PPAR- γ ou le Fabp3 (*fatty acid binding protein 3*) [32].

Cependant, le GPR120 est très peu exprimé au niveau des cellules musculaires [26]. Par conséquent, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline des myocytes par le DHA est secondaire à la réduction de l'inflammation par les oméga-3 et non pas à une action directe du GPR120 musculaire sur cette sensibilité [26].

Enfin, le GPR120 a la capacité d'améliorer la sensibilité à l'insuline du foie. Le foie répond ainsi de manière plus adéquate à l'insuline chez les souris WT que chez les souris GPR120 KO. La présence du GPR120 chez les souris WT réduit la libération de glucose hépatique (*HGP-hepatic glucose production*) [25]. Cet effet est absent lorsque le GPR120 est invalidé et la sensibilité du foie au glucagon est augmentée [37].

Ainsi, le GPR120 semble être réellement impliqué dans l'amélioration de la glycémie et est responsable des effets positifs des acides gras oméga-3 au niveau de l'homéostasie du glucose obtenus dans notre expérience.

4.1.2 Lipidomique

Les résultats obtenus dans notre expérience *in vivo* montrent que les acides gras oméga-3 peuvent améliorer le profil des acides gras en circulation chez les souris ayant reçu au préalable une diète riche en acides gras saturés. On observe ainsi une réduction significative des niveaux d'oméga-6 pro-inflammatoires au profit des oméga-3 anti-inflammatoires (Figure 12).

Nos résultats sont soutenus par plusieurs études qui démontrent également un changement bénéfique du profil des lipides en circulation par les acides gras oméga-3. Une supplémentation en oméga-3 (16% EPA et 9% DHA dans la diète) de 5 semaines chez des souris WT ayant reçu au préalable une diète riche en gras saturés durant 15 semaines augmente ainsi significativement les niveaux circulants d'EPA et de DHA [26]. De plus, lorsque la supplémentation (50 ou 250 mg oméga-3/kg/j) s'étend sur une plus longue période (8 semaines), on observe une réduction du ratio oméga-6/oméga-3 au niveau plasmatique, de la rate et de la membrane des globules rouges [65].

On peut rapprocher ces modifications de lipides en circulation aux modifications obtenues au niveau cellulaire. Le même modèle de changement est en effet constaté au niveau du profil des lipides présents dans les cellules musculaires. Une supplémentation en DHA à partir de 1% peut réduire significativement les proportions d'acide arachidonique oméga-6 des myocytes [32]. De plus, cette supplémentation peut augmenter significativement les niveaux de DHA de 72 à 145% dans les muscles à partir d'un apport contenant 0,1% de DHA [32]. On peut donc faire un parallèle entre les changements lipidiques périphériques et cellulaires suite à l'administration d'oméga-3.

On retrouve cette même amélioration au niveau des lipides hépatiques. Les oméga-3 peuvent ainsi réduire les taux de plusieurs acides gras saturés et oméga-6 au niveau du foie, dont l'acide palmitique, stéarique et arachidonique [26]. Cela est d'autant plus significatif que les lipides se trouvent d'abord dans le foie avant d'être libérés dans le sang sous forme de VLDL (*very low density lipoprotein*). En modifiant ainsi le profil des lipides hépatiques, la nature des lipides qui se retrouveront par la suite en circulation sera également modifiée.

Il est pertinent de noter par ailleurs qu'aucun changement de lipides hépatiques n'est induit par les oméga-3 en l'absence de GPR120 chez des souris GPR120 KO [26]. Ceci informe du rôle potentiel du GPR120 qui permet aux acides gras oméga-3 d'améliorer le profil des lipides hépatiques et en circulation une fois libérés.

Le rôle joué par le GPR120 dans le métabolisme lipidique est d'ailleurs confirmé par l'observation des mêmes améliorations avec une diète riche en CpdA. Le GPR120 stimulé *in vivo* par son agoniste synthétique réduit les acides gras saturés au niveau du foie [25]. De plus, aucun changement lipidique n'est rapporté en l'absence de GPR120 chez les souris GPR120 KO [25].

Ces différents résultats laissent penser que la présence du GPR120 est indispensable pour l'amélioration du métabolisme lipidique et que l'effet des acides gras oméga-3 obtenu dans notre expérience passe probablement par ce récepteur.

4.1.1 Anxiété et dépression

Les acides gras oméga-3 au potentiel anti-inflammatoire agissent sur le comportement anxio-dépressif de diverses manières. Si le lien entre ces acides gras et la dépression est bien établi, celui avec l'anxiété est en revanche plus difficile à déterminer, puisque les études se contredisent et divergent dans leurs résultats.

Le comportement relié à l'anxiété a été évalué dans notre étude par le biais de deux tests, soit le test du labyrinthe en croix surélevée (EPM) et le test du champ ouvert (OFT). Les résultats obtenus dans ces tests, bien qu'ils ne soient pas statistiquement significatifs ($p > 0,05$), sont divergents. On observe ainsi une légère tendance vers la hausse des signes associés à l'anxiété chez les souris supplémentées en acides gras oméga-3 dans l'EPM (Figure 13) et une tendance vers la réduction de ces signes dans l'OFT (Figure 14).

La littérature rapporte également des effets contradictoires des oméga-3 sur l'anxiété des souris. Une étude montre en effet qu'une déficience en oméga-3 augmente le temps passé dans les bras ouverts de l'EPM, et réduit donc l'anxiété [39]. Ces résultats sont contredits par d'autres études qui montrent au contraire que les oméga-3 réduisent l'anxiété et augmentent le temps passé dans les bras ouverts de l'EPM [40] [41]. L'effet anxiolytique des oméga-3 serait d'ailleurs davantage dû au DHA [41].

Au niveau de l'OFT, nos résultats montrent un effet anxiolytique des oméga-3. Ils sont pourtant contredits par une étude qui montre que c'est l'absence d'oméga-3 (diète déficiente en oméga-3 totaux, EPA, DHA et ALA) qui réduit l'anxiété chez les souris [38].

Les études sur le sujet divergent et la relation entre les acides gras oméga-3 et le comportement relié à l'anxiété n'est pas claire à l'heure actuelle. Les expériences futures devraient donc se pencher davantage sur ce lien afin de mieux le caractériser, en veillant à contrôler divers paramètres expérimentaux (sources de stress). Ils peuvent en effet significativement influencer sur les résultats et produire des résultats contraires en fonction des conditions d'expérimentation [43]. Cet aspect-là a été bien contrôlé dans le cadre de nos tests de comportement pour éviter de stresser les souris et de biaiser les résultats. Les souris ont en effet été amenées dans la salle des

tests au moins 30 minutes avant le début de ceux-ci afin qu'elles s'habituent à leur nouvel environnement, les bruits ambiants lors du déroulement des tests ont été minimisés et l'intensité de l'éclairage dans les pièces était adéquate pour ne pas stresser les rongeurs (environ 300 lux selon les recommandations du CCPA-Conseil canadien de protection des animaux).

Les mécanismes par lesquels les acides gras oméga-3 induisent des changements au niveau des signes reliés à l'anxiété sont incertains, même si l'on peut supposer que le GPR120 est impliqué en partie dans ces effets. Il est cependant délicat d'affirmer que les modifications de comportement soient dues exclusivement au GPR120. En effet, les oméga-3 n'activent pas uniquement ce récepteur *in vivo* et leurs effets passent par de multiples voies.

De plus, si le GPR120 participe réellement aux changements induits par les acides gras oméga-3, il serait pertinent de déterminer la localisation de ces récepteurs activés, afin de savoir si c'est l'effet du GPR120 central, périphérique ou des deux qui produit les résultats observés. Seule une étude s'est penchée sur l'effet spécifique du GPR120 central sur l'anxiété et elle démontre que ce récepteur a des propriétés anxiolytiques chez les souris lorsqu'il est activé de manière chronique [46].

Plusieurs questions restent en suspens concernant les acides gras oméga-3 et l'anxiété, et les expériences futures devraient tenter de les élucider:

- Quelles sont les voies empruntées par les acides gras oméga-3 et qui impactent le comportement relié à l'anxiété (augmentation ou atténuation des signes)?
- Quelle est la nature réelle du lien entre les acides gras oméga-3 et l'anxiété?
- Le GPR120 est-il impliqué dans les effets observés?
- Quels sont les impacts réels de la stimulation du GPR120 central et périphérique au niveau de l'anxiété?

Des études mécanistiques devraient donc être réalisées pour mieux caractériser les voies qui sous-tendent les effets des acides gras oméga-3 sur l'anxiété. D'autre part, afin d'étudier davantage le rôle du GRP120, il pourrait être activé *in vivo* chez des souris WT durant plusieurs semaines par des agonistes spécifiques en périphérie (via une diète riche en Cpda) et au niveau central (via une canule ICV). Par la suite, des tests de comportement pourront être réalisés afin de mesurer l'anxiété chez les souris (EPM, OFT etc.), tout en contrôlant adéquatement les paramètres

expérimentaux. Les hypothèses formulées sur l'effet anxiolytique potentiel du GPR120 peuvent être évaluées en reproduisant les mêmes expériences sur des modèles KO de souris, afin d'étudier l'effet de l'absence de ce récepteur sur le comportement.

De plus, il serait intéressant de se pencher spécifiquement sur l'effet de l'inactivation centrale du GPR120 microglial avec notre modèle KO non global ($CX_3CR1^{CreER/+};GPR120^{fl/fl}$). Cela permettra de faire plus aisément le parallèle entre la neuro-inflammation / l'inflammation centrale et l'anxiété. Ces aspects devraient donc être explorés davantage dans le futur afin de raffiner nos connaissances actuelles sur les effets comportementaux du GPR120 qui semble être une cible thérapeutique très prometteuse.

Au niveau de la dépression, nous avons démontré que les acides gras oméga-3 réduisent les symptômes liés à la dépression dans le cadre du test de nage forcée (FST) chez des souris ayant reçu au préalable une diète riche en acides gras saturés (Figure 15). Nos résultats sont confirmés par plusieurs études qui démontrent également une réduction de l'immobilité à l'issue d'une supplémentation en oméga-3 [49] [59] [60]. Alors que nos travaux se sont portés sur l'effet de la combinaison de l'EPA et du DHA sur le comportement dépressif, certaines études ont évalué le rôle spécifique de chacun de ces types d'oméga-3 sur le temps d'immobilité. L'effet antidépresseur des oméga-3 serait davantage attribuable au DHA [59] et l'EPA serait inefficace dans la réduction de l'immobilité lors du FST [60]. Toutefois, cela n'empêche pas de formuler l'hypothèse d'une potentielle synergie entre l'EPA et le DHA lorsqu'ils sont administrés en concomitance. On retrouve ces effets protecteurs dans les études humaines également autant chez les adultes [52] que chez les enfants [53].

Même si les études démontrent une réduction du comportement dépressif par les acides gras oméga-3, plusieurs questions restent en suspens et les études futures devraient tenter de les élucider:

- Quelles sont les voies empruntées par les acides gras oméga-3 pour réduire la dépression?
- Le GPR120 est-il impliqué dans ces effets, sachant que ce récepteur a un potentiel anti-inflammatoire et que certaines formes de dépression sont associées à une inflammation marquée?
- Les acides gras oméga-3 sont-ils efficaces pour tous les types de dépression ou uniquement dans le cadre des dépressions ayant une étiologie inflammatoire?

- La réduction des signes reliés à la dépression par les acides gras oméga-3 est-elle due au GPR120 central, périphérique ou à l'action des deux? (dans l'éventualité où le GPR120 est impliqué dans le mécanisme antidépresseur des oméga-3).
- Existe-t-il une synergie entre l'EPA et le DHA lorsqu'ils sont administrés en même temps?

Des études mécanistiques devraient donc être menées afin de caractériser davantage les voies et récepteurs impliqués dans la réduction des symptômes associés à la dépression par les oméga-3. De plus, le rôle potentiel du GPR120 dans la réduction de la dépression devrait être étudié plus spécifiquement chez des souris WT en activant ce récepteur *in vivo* en périphérie (via une diète riche en CpdA) et au niveau central (via une canule ICV). Par la suite, des tests de comportement pourront être réalisés afin de mesurer le comportement associé à la dépression chez les souris (FST). Ces expériences pourront par la suite être répétées sur des modèles KO de souris, afin d'étudier l'effet de l'absence de ce récepteur sur le comportement. Une invalidation du GPR120 microglial sur des souris $CX_3CR1^{CreER/+};GPR120^{fl/fl}$ serait intéressante à étudier au vu de l'association entre la dépression et l'inflammation centrale médiée par la microglie [17] [47]. Ces aspects devraient donc être explorés davantage dans le futur afin de raffiner nos connaissances sur le sujet et caractériser davantage les effets comportementaux du GPR120.

4.2 Interprétation des résultats *in vitro*

4.2.1 Neuro-inflammation

Dans le cadre de notre expérience, les cellules microgliales primaires ont été exposées au CpdA durant 1h, suivi par le LPS durant 6h pour induire une inflammation aiguë. La stimulation du GPR120 par le CpdA s'est traduite par une réduction significative de l'expression génique et protéique de plusieurs cytokines *in vitro*. Le CpdA a réduit en effet significativement l'expression génique d'IL-1 β , d'IL-6, de MCP-1 et de TNF- α (Figure 16), et l'expression protéique d'IL-6, de MCP-1 et de TNF- α (Figure 17).

Nos résultats sont soutenus par quelques études que l'on retrouve dans la littérature. Le GPR120 des cellules microgliales primaires a ainsi un potentiel anti-inflammatoire lorsqu'il est activé par le CpdA *in vitro*. Ceci se traduit par une réduction du NF- κ B, du TNF- α et de l'IL-1 β [86]. Le CpdA réduit également l'inflammation *in vitro* lorsque des cellules immortalisées de

macrophages (RAW 264.7) sont exposées au CpdA. La stimulation du GPR120 des macrophages se traduit par une baisse des cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 [interleukine-1], iNOS) et par l'augmentation de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) [87]. L'effet anti-inflammatoire du GPR120 des macrophages (RAW 264.7) est également obtenu lorsque le récepteur est stimulé par un autre agoniste synthétique (GW9508). Ceci se traduit par une baisse de l'activation de la voie pro-inflammatoire NF- κ B et du niveau de plusieurs cytokines (TNF- α , IL-6 etc.) [26]. Les données de la littérature sont comparables à nos résultats, surtout que les conditions expérimentales sont semblables. Les cellules microgliales sont en effet exposées aux agonistes du GPR120 durant près d'une heure (45 minutes [86], 1h [26]), suivi d'un temps d'exposition au LPS de 6h [86]. De plus, la concentration de CpdA utilisée dans certaines études est la même que la notre (10 μ M) [86]. Toutefois, la quantité de LPS de notre expérience (100 ng/ml) est inférieure à celle utilisée dans la littérature (20 μ g/ml [86]). Le GPR120 microglial possède ainsi des propriétés anti-inflammatoires et peut réduire la neuro-inflammation lorsqu'il est activé par ses agonistes.

Même si l'on retrouve dans la littérature quelques études s'étant penchées sur la stimulation spécifique du GPR120 microglial *in vitro* par le CpdA, elles restent peu nombreuses. Ceci rend difficile l'interprétation de nos résultats et leur mise en contexte avec la littérature.

La grande majorité des études a en effet exposé les cellules microgliales à d'autres agonistes du GPR120 que le CpdA, soit aux acides gras oméga-3. Ces études démontrent que les oméga-3 réduisent l'inflammation lorsque les cellules microgliales primaires [68] [69] et immortalisées [64] [66] y sont exposées. Cependant, il est difficile d'affirmer que le GPR120 microglial est entièrement responsable de l'effet anti-inflammatoire des oméga-3. Même si les oméga-3 sont des agonistes du GPR120, ils activent plusieurs voies / récepteurs et ne sont pas exclusifs au GPR120. L'effet anti-inflammatoire des oméga-3 passe en effet par diverses voies dont celles de la famille PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) [88]. L'effet des acides gras oméga-3 sur la neuro-inflammation peut donc être dû à l'activation simultanée de plusieurs récepteurs couplés aux protéines G en plus du GPR120, tels que le GPR40 (*G-protein coupled receptor 40*) et le GPR119 (*G-protein coupled receptor 119*) [88]. Ces récepteurs ont une structure proche de celle du GPR120 et peuvent être activés par les mêmes ligands que le GPR120, tels que les oméga-3 [72]. On peut alors émettre l'hypothèse que c'est par un effet

synergique entre le GPR40, le GPR119 et le GPR120 que les acides gras oméga-3 réduisent la neuro-inflammation. Il est donc difficile de conclure à l'effet anti-inflammatoire du GPR120 microglial puisque ce récepteur n'est pas exclusivement activé par ces acides gras.

Afin de déterminer le rôle précis joué par le GPR120 dans les effets des oméga-3 *in vivo*, il serait intéressant d'activer ce récepteur par un agoniste spécifique et de comparer les effets sur le métabolisme et le comportement avec une diète riche en oméga-3. Le choix de l'agoniste du GPR120 doit être fait minutieusement, car une grande partie d'entre eux active le GPR120 et d'autres récepteurs proches au niveau de la structure. Bien que certains agonistes synthétiques du GPR120 soient efficaces, il en existe peu qui soient spécifiques au GPR120 et qui ne reconnaissent pas d'autres récepteurs [89]. Le fonctionnement du GPR120 doit donc être davantage caractérisé et étudié afin d'élaborer le meilleur agoniste synthétique et spécifique au récepteur.

Le CpdA quant à lui est spécifique au GPR120 et l'active uniquement, ce qui permet d'attribuer les résultats au GPR120 et d'affirmer avec certitude son potentiel anti-inflammatoires. Il serait donc pertinent d'augmenter le nombre d'études *in vitro* qui exposent la microglie au CpdA. De plus, le choix devrait se porter sur des cellules microgliales primaires car elles reflètent de manière plus fiable la réponse inflammatoire réelle des cellules [67]. Enfin, ces expériences pourront être effectuées sur des cellules microgliales humaines immortalisées afin de vérifier si les résultats obtenus sur les cellules des rongeurs sont similaires et transposables chez l'homme. Cela permettra de transposer les résultats des cellules animales vers les cellules humaines et de mieux apprécier l'effet réel que pourrait avoir un traitement futur qui activerait le GPR120 microglial chez l'homme.

4.2.2 Activation de la microglie

Dans notre étude, nous rapportons une modification bénéfique du phénotype microglial suite à l'exposition des cellules primaires aux agonistes du GPR120 (CpdA et oméga-3) en contexte d'inflammation aigüe (Figure 18). Les cellules microgliales du cerveau sont moins actives et cela se traduit par une réduction significative de la forme pro-inflammatoire M1 au profit de la forme non-activée M2 en présence de DHA et de CpdA ($p < 0,05$). L'EPA réduit également l'activation de la microglie mais de manière non significative ($p > 0,05$). La stimulation du GPR120

microglial par ses agonistes module donc le phénotype de la microglie en réduisant le phénotype inflammatoire.

Les mêmes résultats sont retrouvés dans la littérature, où la réduction de l'inflammation *in vitro* par le CpdA se traduit par une baisse du phénotype M1 inflammatoire au profit du phénotype M2 anti-inflammatoire [87]. De plus, nos résultats obtenus avec le DHA rejoignent certaines études qui démontrent également une réduction significative de la forme M1 par le DHA au bout de 24h en contexte d'inflammation aiguë [69] [70]. Concernant l'effet de l'EPA sur la morphologie de la microglie, la littérature démontre un changement significative de la polarisation; réduction de la forme M1 [69] [70] et augmentation de la forme M2 [69]. Nos résultats démontrent au contraire que l'EPA n'a pas d'effet significatif sur la polarisation de la microglie. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette divergence statistique:

À l'inverse des études recensées, le phénotype de la microglie a été déterminé dans notre expérience de manière visuelle en analysant divers clichés des cellules exposées aux différentes conditions. Même si ces analyses se sont déroulées en aveugle, il existe un biais d'interprétation, dans la mesure où il se peut que certaines cellules n'aient pas été correctement identifiées (forme M1 au lieu de M2). Ceci peut expliquer que l'EPA n'ait pas eu un effet significatif sur le changement de morphologie des cellules.

Les études recensées ont caractérisé le phénotype microglial en analysant par RT-PCR (*real time polymerase chain reaction*) l'expression de certains gènes et marqueurs associés aux formes M1 (CD40, CD86 etc.) et M2 (CD206 etc.). Cette méthode permet d'avoir un reflet plus fiable de la polarisation de la microglie que celui obtenu avec notre méthode et d'expliquer possiblement la divergence statistique obtenue pour l'EPA [69] [70].

Un autre facteur pouvant expliquer cette divergence est la différence de concentration d'oméga-3 qui varie selon les études. Nous avons en effet exposé les cellules à 10 μ M d'agonistes du GPR120 (DHA, EPA, CpdA), ce qui est inférieur à certaines études qui ont opté pour une concentration en oméga-3 doublement supérieure, soit 20 μ M [69]. Ceci peut possiblement expliquer la divergence statistique des résultats pour l'EPA, car une concentration supérieure stimule les cellules davantage et donne probablement des résultats plus significatifs.

Il est à noter toutefois que nos tests de morphologie ont été effectués sur des cellules microgliales primaires et non pas immortalisées comme la plupart des études recensées. Or, il est préférable

d'opter pour des cellules primaires pour l'étude morphologique de la microglie car elles produisent des résultats plus fiables et plus représentatifs de la réalité [67].

Le GPR120 a ainsi la capacité de modifier le profil des cellules de la microglie de manière bénéfique et d'en réduire l'activation lorsqu'il est activé par ses agonistes.

4.3 Implication réelle du GPR120

La littérature rapporte plusieurs effets positifs des oméga-3 *in vivo* au niveau de l'amélioration du comportement anxio-dépressif, du métabolisme et de l'inflammation. Ces données sont également confirmées par nos résultats sur les souris. Les actions des oméga-3 passent entre autres par l'activation du GPR120 *in vivo* et ne sont plus observées en l'absence du récepteur [26]. Les souris GPR120 KO soumises à une diète riche en oméga-3 ont par exemple une plus grande résistance à l'insuline au niveau des muscles et du foie, une plus grande stéatose hépatique et des niveaux moindre d'oméga-3 en circulation [26]. Le FFA4 semble donc être indispensable pour promouvoir les effets bénéfiques des oméga-3 *in vivo* au niveau de l'homéostasie glucidique et lipidique.

Cependant, le rôle attribué au GPR120 est controversé et est remis en question par diverses études. Celles-ci démontrent que les effets des oméga-3 *in vivo* sur l'inflammation et le métabolisme ne passent pas par le GPR120 et que la présence de celui-ci n'est pas nécessaire pour observer les changements induits par les oméga-3.

Le niveau de résistance à l'insuline est par exemple le même chez les souris GPR120 KO et hétérozygotes GPR120 suite à l'administration d'une diète riche en oméga-3 (14,9% d'huile de poisson) durant 32 semaines [88]. De plus, les souris GPR120 KO et hétérozygotes bénéficient toutes les deux des effets protecteurs des oméga-3 au niveau métabolique. Les niveaux circulants d'insuline et d'adiponectine sont ainsi similaires à l'issue de la supplémentation en oméga-3, indépendamment de la présence du GPR120 et du génotype des souris [88]. Il en est de même pour l'inflammation au niveau du tissu adipeux viscéral des souris KO et hétérozygotes.

L'expression de certaines cytokines pro-inflammatoire (IL-6 et MCP-1) est similaire chez les souris suite à l'administration des oméga-3 [88]. De plus, il n'y a aucune différence significative entre les souris KO et WT qui sont supplémentées en oméga-3 (75 g/kg) durant 18 semaines. Ainsi, la prise alimentaire, la tolérance au glucose, la masse grasse, et les niveaux de lipides

hépatiques sont comparables dans ces deux groupes de souris [90]. Plus surprenant encore, la tolérance au glucose est légèrement meilleure chez les souris KO que chez les souris WT, même si les résultats ne sont pas significatifs [90].

La présence du GPR120 ne semble donc pas être indispensable pour observer les effets métaboliques chez les souris suite à une supplémentation en acides gras oméga-3. Plus d'études sont nécessaires pour pouvoir se prononcer sur l'implication réelle du GPR120 dans les résultats *in vivo* à l'issue de l'administration des oméga-3 aux souris

4.4 Forces et limites de l'étude

Cette étude possède plusieurs forces et se démarque des précédentes réalisées sur le sujet. Les expériences *in vivo* réalisées chez les souris en inflammation chronique informent de l'impact que peut avoir ces acides gras chez les individus dans notre société occidentale. Nous sommes en effet exposés quotidiennement à des aliments riches en acides gras saturés et sommes plus à risque d'inflammation induite par la diète. La diète HFD chronique administrée aux souris mime les apports alimentaires d'une grande partie des individus dans notre environnement moderne obésogène. Les résultats obtenus suite à la supplémentation en oméga-3 indiquent que celle-ci serait bénéfique dans notre société et permettrait d'améliorer le métabolisme et les comportements anxio-dépressifs.

Au niveau central, il existe à ce jour peu ou pas d'études ayant démontré l'existence du GPR120 au niveau de la microglie. Cet aspect est important compte tenu du potentiel anti-inflammatoire de ce récepteur et son implication dans la réduction de la neuro-inflammation. Les expériences réalisées *in vitro* informent des effets anti-inflammatoires que pourraient avoir certains traitements thérapeutiques futurs qui viseraient à activer spécifiquement le GPR120 microglial. Les manipulations *in vitro* ont par ailleurs été effectuées sur des cellules microgliales primaires contrairement à la majorité des autres études, et cet aspect-là augmente la force de notre étude. Les réponses inflammatoires et morphologiques des cellules issues de lignée immortalisées diffèrent en effet de celles des cellules primaires et ne reflètent pas de manière fiable ce qui se passe dans l'organisme [67]. En optant pour des cellules microgliales primaires, cela augmente la fiabilité des résultats inflammatoires et de la polarisation de la microglie en réponse à l'activation du GPR120 microglial.

D'autre part, la fonction anti-inflammatoire du GPR120 microglial a été testée *in vitro* en stimulant le récepteur sur des cellules WT et en analysant l'impact de son absence sur des cellules KO. Les expériences sur les cellules KO ont permis de corroborer les résultats obtenus sur les cellules WT. L'absence du GPR120 n'induit aucun changement dans l'inflammation en présence de CpdA et permet de confirmer que la présence du récepteur est indispensable dans la réduction de la neuro-inflammation.

Les cellules microgliales KO proviennent par ailleurs de souris transgéniques de type $CX_3CR1^{CreER/+};GPR120^{fl/fl}$ chez lesquelles l'inactivation du GPR120 est spécifique aux cellules CX_3CR1^+ , soit aux cellules de la microglie au niveau central. L'utilisation de ces souris permet ainsi de n'invalider que le GPR120 microglial et d'en étudier les effets spécifiques. De plus, il s'agit d'une inactivation conditionnelle du gène du GPR120 microglial par le biais du système Cre-Lox et pas d'une inactivation totale dans les cellules souches embryonnaires des souris. Le KO dans la microglie peut donc être induit au moment voulu par l'administration de Tamoxifène. Cela réduit les risques d'adaptation et de compensation à cette mutation durant le développement qui se mettent en place surtout lorsque l'inactivation est totale. La fiabilité de notre étude est donc élevée comparé à la plupart des études qui utilisent un modèle KO total du GPR120, non spécifique au GPR120 microglial.

Les études *in vitro* de la littérature ont par ailleurs été réalisées en majorité sur des cellules microgliales WT et peu d'entre elles ont opté pour des cellules KO. De plus, l'agoniste du GPR120 qui a été choisi (CpdA) est spécifique à celui-ci et possède une haute affinité avec son récepteur [25]. La spécificité du CpdA au GPR120 permet d'attribuer les effets anti-inflammatoires observés à la seule action de ce récepteur. Le choix du CpdA pour activer le GPR120 *in vitro* s'avère être plus efficace que les oméga-3 qui ont été choisis en majorité dans les études microgliales *in vitro*. Ces acides gras activent en effet plusieurs voies cellulaires et récepteurs à la fois, ce qui ne permet pas d'étudier clairement le rôle du GPR120. Enfin, notre étude est pertinente dans l'optique de développer un traitement contre la dépression associée à une neuro-inflammation, l'inflammation, l'obésité et le diabète qui ciblerait spécifiquement et uniquement le GPR120 microglial. Un tel médicament est d'autant plus intéressant que les quantités d'oméga-3 qu'il faudrait consommer pour avoir les effets mentionnés de manière durable sont trop élevées pour avoir un impact clinique significatif [25].

Cette étude possède également des limites parmi lesquelles nous pouvons citer la difficulté de dire si les améliorations du métabolisme et du comportement des souris par les acides gras oméga-3 *in vivo* sont dues uniquement à l'action du GPR120. Il aurait été pertinent de vérifier l'activation du GPR120 *in vivo* en mesurant par exemple l'expression génique par qPCR du récepteur et des diverses protéines impliquées dans son activation (TAB1, TAK1 etc.). Ces mesures peuvent être faite sur plusieurs types cellulaires (pancréas, muscles, tissu adipeux, cerveau etc.) prélevés à l'issue des semaines de diète. Cela permet de mesurer le niveau de stimulation du GPR120 et d'étudier son implication dans les effets des oméga-3 *in vivo*.

Un autre moyen de valider l'implication du GPR120 est de répéter la même expérience de diète sur des souris $CX_3CR1^{CreER/+};GPR120^{fl/fl}$ dont le gène du GPR120 est invalidé *in vivo* par des doses répétées de Tamoxifène par gavage. La comparaison de l'effet des oméga-3 chez ces souris KO par rapport aux souris WT reflètera l'impact de l'absence du récepteur au niveau central et son rôle spécifique sur le métabolisme et le comportement.

Un autre aspect qui n'a pas été exploré à l'issue des expériences *in vivo* est la part des différentes composantes de la dépense énergétique chez les souris supplémentées en oméga-3. Ce point aurait pourtant été intéressant à étudier pour expliquer l'amélioration de l'efficacité énergétique suite aux oméga-3 et connaître davantage les changements métaboliques induits ces acides gras (type de macronutriment oxydé, température corporelle, thermogénèse etc.). Parmi les trois composantes de la dépense énergétique, la thermogénèse aurait été étudiée plus en détails. Les acides gras oméga-3 augmentent en effet l'activité du tissu adipeux brun (BAT - *Brown adipose tissue*) à travers le GPR120, suite à la libération du FGF21 (*fibroblast growth factor 21*) par les adipocytes chez les souris [91]. Le FGF21 active à son tour une protéine découplante au niveau du BAT, l'UCP-1 (*uncoupling protein 1*), qui découple la chaîne respiratoire de la production d'énergie et libère l'énergie sous forme de chaleur. La thermogénèse et la dépense énergétique augmentent ainsi suite à l'action des oméga-3 [91]. Il en est de même chez les humains, où une supplémentation en acides gras oméga-3 assure le bon fonctionnement du BAT en réduisant la libération de $PGF_2\alpha$ [Prostaglandine $F_{2\alpha}$] qui est un inhibiteur de l'UCP-1 [92]. L'utilisation de cages métaboliques ou CLAMS (*Comprehensive Lab Animal Monitoring System*) serait donc à envisager dans les expériences futures pour mieux caractériser et comprendre l'effet métabolique des acides gras oméga-3.

On peut également citer le fait qu'aucune mesure inflammatoire n'a été réalisée *in vivo* chez les souris ayant reçu la diète riche en gras saturés afin d'évaluer leur état inflammatoire. Cet aspect-là aurait pourtant été intéressant à tester pour confirmer ou non l'inflammation chronique induite par la diète chez les souris du groupe HFD.

Enfin, plusieurs souris du groupe Ctrl + FO ont eu des problèmes tels que des anémies et des saignements et la moitié d'entre elles est décédée. Ceci a limité certaines analyses statistiques puisque la taille de l'échantillon s'en est trouvée réduite pour plusieurs tests (EPM, OFT, FST) et ce groupe a été exclu des analyses dans d'autres tests (glycémie, lipidomique).

Pour les expériences *in vitro*, la viabilité des cellules suite à l'exposition au Tamoxifène et au LPS n'a pas été vérifiée. Il aurait pourtant été pertinent de vérifier cet aspect pour s'assurer que les doses administrées ne sont pas toxiques et qu'elles sont adéquates pour ne pas biaiser les résultats. D'autre part, l'effet préventif du GPR120 sur l'inflammation a été étudié en exposant la microglie d'abord au CpdA et ensuite au LPS. Il serait intéressant dans les recherches ultérieures de répéter ces expériences en inversant l'ordre d'exposition des cellules aux molécules (LPS suivi du CpdA) et de voir si les résultats obtenus sont comparables. On pourra ainsi étudier l'effet de la stimulation du GPR120 dans un milieu soumis à une inflammation importante et voir s'il est en mesure de renverser l'inflammation.

Un autre point faible de cette étude est le possible biais d'interprétation de la morphologie des cellules microgliales. L'analyse du phénotype de la microglie et le décompte du nombre de cellules actives M1 ont été réalisés de manière visuelle, contrairement à la littérature. Dans ces études, les analyses ont été effectuées de manière plus fiable en mesurant par RT-PCR l'expression de gènes et marqueurs associés aux formes microgliales M1 et M2 [69] [70]. Même si nos analyses ont été faites en aveugle, il se peut qu'il y ait certaines mauvaises identifications involontaires du phénotype, ce qui rend l'interprétation des résultats de la morphologie cellulaire plus délicate.

5. Conclusion et pistes de recherche

Au terme des expériences menées et des données probantes présentes dans la littérature, on peut dire que les acides gras oméga-3 agissent *in vivo* au niveau du comportement et du métabolisme. Ces acides gras réduisent ainsi chez les souris certains signes associés à l'anxiété et la dépression qui sont induit par une diète riche en gras saturés. De plus, les acides gras de type oméga-3 améliorent certains paramètres métaboliques tels que l'homéostasie glucidique, le profil des lipides en circulation et l'efficacité énergétique.

Même si les acides gras oméga-3 sont des agonistes du GPR120, il est difficile à l'heure actuelle de confirmer l'implication de ce récepteur dans les changements *in vivo* induits par ces acides gras. Les études ultérieures devraient se pencher davantage sur la part d'implication du GPR120 dans les effets des oméga-3 *in vivo* et sur les mécanismes qui sont mis en place.

D'autre part, le GPR120 microglial peut réduire la neuro-inflammation. Cela se traduit par une réduction significative des cytokines pro-inflammatoires *in vitro*, particulièrement du TNF- α , du MCP-1 et de l'IL-6. De plus, la stimulation du GPR120 entraîne une modification du phénotype des cellules microgliales en réduisant la forme activée M1 au profit de la forme non activée M2. Le GPR120 est donc une cible intéressante pour l'élaboration future et potentielle de traitements pour certaines pathologies associées à une inflammation et qui sont croissantes dans nos sociétés obésogènes (dépression, diabète de type 2, obésité etc.).

Bibliographie

- [1] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). (2016). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. *Lancet*, 387: 1377–96.
- [2] Cohen D.A. (2008). Obesity and the built environment: changes in environmental cues cause energy imbalances. *International journal of obesity*, 32: S137–S142.
- [3] Moubarac J.C., Batal M., Martins A.P., Claro R., Levy R.B., Cannon G., & Monteiro C. (2014). Processed and ultraprocessed food products: Consumption trends in Canada from 1938 to 2011. *Canadian journal of dietetic practice and research*, 75(1): 15-21.
- [4] Statistique Canada, Embonpoint et obésité chez les adultes (mesures autodéclarées), 2014.
- [5] Apovian C.M. (2010). The causes, prevalence, and treatment of obesity revisited in 2009: what have we learned so far? *The american journal of clinical nutrition*, 91(1): 277S–279S.
- [6] Sweet L.H., Hassenstab J.J., McCaffery J.M., Raynor H.A., Bond D.S., Demos K.E., Haley A.P., Cohen R.A., Parigi A.D., & Wing R.R. (2012). Brain response to food stimulation in obese, normal weight, and successful weight loss maintainers. *Obesity (silver spring)*, 20 (11): 2220-2225.
- [7] Lumeng C.N., Saltiel A.R. (2011). Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *Journal of clinical investigation*, 121 (6): 2111-2117.
- [8] Thaler J.P., Yi C.X., Schur E.A., Guyenet S.J., Hwang B.H., Dietrich M.O., Zhao X., Sarruf D.A., Izgur V., Maravilla K.R., Nguyen H.T., Fischer J.D., Matsen M.E., Wisse B.E., Morton G.J., Horvath T.L., Baskin D.G., Tschöp M.H., & Schwartz M.W. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *Journal of clinical investigation*, 122 (1): 153-62.
- [9] Cai D., & Liu T. (2011). Hypothalamic inflammation: a double-edged sword to nutritional diseases. *Annals of the New York academy of sciences*, 1243: E1–39.
- [10] Cesar H.C., & Pisani L.P. (2017). Fatty-acid-mediated hypothalamic inflammation and epigenetic programming. *Journal of nutritional biochemistry*, 42: 1–6.
- [11] Maldonado-Ruiz R., Montalvo-Martínez L., Fuentes-Mera L., & Camacho A. (2017). Microglia activation due to obesity programs metabolic failure leading to type two diabetes. *Nutrition & diabetes*, 7 (3): 254.

- [12] Guillemot-Legris O., & Muccioli G.G. (2017). Obesity-induced neuroinflammation: Beyond the hypothalamus. *Trends in neurosciences*, 40 (4).
- [13] Nguyen J.C.D., Killcross A.S., & Jenkins T.A. (2014). Obesity and cognitive decline: role of inflammation and vascular changes. *Frontiers in neuroscience*, 8: 375.
- [14] Jantaratnotai N., Mosikanon K., Lee Y., & McIntyre R.S. (2017). The interface of depression and obesity. *Obesity research & clinical practice*, 11 (1): 1-10.
- [15] Luppino F.S., de Wit L.M., Bouvy P.F., Stijnen T., Cuijpers P., Penninx B.W., & Zitman F.G. (2010). Overweight, obesity, and depression: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Archives of general psychiatry*, 67 (3): 220–229.
- [16] Hryhorczuk C., Sharma S., & Fulton S. (2013). Metabolic disturbances connecting obesity and depression. *Frontiers in neuroscience*, 7: 177.
- [17] Miller A.H., Maletic V., & Raison C.L., (2009). Inflammation and its discontents: The role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biological psychiatry*, 65 (9): 732–741.
- [18] Décarie-Spain L., Sharma S., Hryhorczuk C., Issa-Garcia V., Barker P.A., Arbour N., Alquier T., & Fulton S. (2018). Nucleus accumbens inflammation mediates anxiodepressive behavior and compulsive sucrose seeking elicited by saturated dietary fat. *Molecular metabolism*, 10: 1-13.
- [19] Sharma S., & Fulton S. (2013). Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *International journal of obesity*, 37: 382-389.
- [20] Volkow N.D., Wang G.J., Tomasi D., & Baler R.D. (2013). The addictive dimensionality of obesity. *Biological psychiatry*, 73 (9): 811-818.
- [21] Bornstein S.R., Schuppenies A., Wong M.L., & Licinio J. (2006). Approaching the shared biology of obesity and depression: the stress axis as the locus of gene-environment interactions. *Molecular psychiatry*, 11 (10): 892-902.
- [22] Swanson D., Block R., & Mousa S.A. (2012). Omega-3 fatty acids EPA and DHA: Health benefits throughout life. *Advances in nutrition*, 3 (1): 1–7.
- [23] Lamantia V., Sniderman A., & Faraj M. (2016). Nutritional management of hyperapoB. *Nutrition research reviews*, 29 (2): 202-233.
- [24] Oh D.Y., & Olefsky J.M. (2012). Omega 3 fatty acids and GPR120. *Cell metabolism*, 15 (5): 564–565.

- [25] Oh D.Y., Walenta E., Akiyama T.E., Lagakos W.S., Lackey D., Pessentheiner A.R., Sasik R., Hah N., Chi T.J., Cox J.M., Powels M.A., Di Salvo J., Sinz C., Watkins S.M., Armando A.M., Chung H., Evans R.M., Quehenberger O., McNelis J., Bogner-Strauss J.G., & Olefsky J.M. (2014). A GPR120 selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation. *Nature medicine*, 20 (8): 942–947.
- [26] Oh D.Y., Talukdar S., Bae E.J., Imamura T., Morinaga H., Fan W., Li P., Lu W.J., Watkins S.M., & Olefsky J.M. (2010). GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*, 142: 687–698.
- [27] Mostowik M., Gajos G., Zalewski J., Nessler J., & Undas A. (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase plasma adiponectin to leptin ratio in stable coronary artery Disease. *Cardiovascular drugs and therapy*, 27 (4): 289–295.
- [28] Gray B., Steyn F., Davies P.S., & Vitetta L. (2013). Omega-3 fatty acids: A review of the effects on adiponectin and leptin and potential implications for obesity management. *European Journal of clinical nutrition*, 67 (12): 1234–1242.
- [29] Lu H.L., Wang H.W., Wen Y., Zhang M.X., & Lin H.H. (2006). Roles of adipocyte derived hormone adiponectin and resistin in insulin resistance of type 2 diabetes. *World journal of gastroenterology*, 12 (11): 1747-1751.
- [30] Kalupahana N.S., Claycombe K.J., & Moustaid-Moussa N. (2011). (n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: Mechanistic insights. *American society for nutrition. Advances in nutrition*, 2 (4): 304–316.
- [31] Albert B.B., Derraik J.G., Brennan C.M., Biggs J.B., Smith G.C., Garg M.L., Cameron-Smith D., Hofman P.L., & Cutfield W.S. (2014). Higher omega-3 index is associated with increased insulin sensitivity and more favorable metabolic profile in middle-aged overweight men. *Scientific Reports*, 4: 6697.
- [32] Capel F., Acquaviva C., Pitois E., Laillet B., Rigaudière J.P., Jouve C., Pouyet C., Comte B., Vianey Saban C., & Morio B. (2015). DHA at nutritional doses restores insulin sensitivity in skeletal muscle by preventing lipotoxicity and inflammation. *Journal of nutritional biochemistry*, 26 (9): 949-59.
- [33] Haas J.T., & Biddinger S. (2009). Dissecting the role of insulin resistance in the metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology*, 20 (3): 206–210.

- [34] Talukdar S., Olefsky J.M., & Osborn O. (2011). Targeting GPR120 and other fatty acid sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammation diseases. *Trends in pharmacological sciences*, 32 (9): 543–550.
- [35] Zhang D., & Leung P.S. (2014). Potential roles of GPR120 and its agonists in the management of diabetes. *Drug Design, Development and Therapy*, 8: 1013–1027.
- [36] Hirasawa A., Tsumaya K., Awaji T., Katsuma S., Adachi T., Yamada M., Sugimoto Y., Miyazaki S., & Tsujimoto G. (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature medicine*, 11: 90–94.
- [37] Suckow A.T., Polidori D., Yan W., Chon S., Ying J.M., Leonard J., & Briscoe C.P. (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.
- [38] Grundy T., Toben C., Jaehne E.J., Corrigan F., & Baune B.T. (2014). Long-term omega-3 supplementation modulates behavior, hippocampal fatty acid concentration, neuronal progenitor proliferation and central TNF- α expression in 7 month old unchallenged mice. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8: 399.
- [39] Frances H., Monier C., & Bourre J.M. (1995). Effects of dietary α -linolenic acid deficiency on neuromuscular and cognitive functions in mice. *Life sciences*, 57: 1935-1947.
- [40] Carrie I., Clement M., De Javel D., Frances H., & Bourre J.M. (2000). Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *The journal of lipid research*, 41: 473-480.
- [41] Takeuchi T., Iwanaga M., & Harada E. (2003). Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. *Brain research*, 964: 136-143.
- [42] Harauma A., & Moriguchi T. (2011). Dietary n-3 fatty acid deficiency in mice enhances anxiety induced by chronic mild stress. *Lipids*, 46: 409–416.
- [43] Fedorova, I., & Salem, N. Jr. (2006). Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 75: 271–289.
- [44] Buydens-Branchey L., Branchey M., & Hibbeln J.R. (2008). 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*, 32 (2): 568-75.

- [45] Kiecolt-Glaser J.K., Belury M.A., Andridge R., Malarkey W.B., & 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.
- [46] Auguste S., Fiset A., Fernandes M.F., Hryhorczuk C., Poitout V., Alquier T., & Fulton S. (2016). Central agonism of GPR120 acutely inhibits food intake and food reward and chronically suppresses anxiety-like behavior in mice. *International journal of neuropsychopharmacology*, 19 (7): 1–10.
- [47] Su K.P., Lai H.C., Yang H.T., Su W.P., Peng C.Y., Chang J.P., Chang H.C., & Pariante C.M. (2014). Omega-3 fatty acids in the prevention of interferon alpha-induced depression: Results from a randomized, controlled trial. *Biological psychiatry*, 76 (7): 559-566.
- [48] Lee B.H., & Kim Y.K. (2010). The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry investigation*, 7 (4): 231-235.
- [49] Venna V.R., Deplanque D., Allet C., Belarbi K., Hamdane M., & Bordet R. (2009). PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology*, 34 (2): 199-211.
- [50] Grosso G., Micek A., Marventano S., Castellano S., Mistretta A., Pajak A., & Galvano F. (2016). Dietary n-3 PUFA, fish consumption and depression: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Journal of Affective Disorders*, 205: 269–281.
- [51] Lin P.Y., Huang S.Y., & Su K.P. (2010). A meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in patients with depression. *Biological psychiatry*, 68: 140–7.
- [52] Ganaça L., Galfalvy H.C., Oquendo M.A., Hezghia A., Cooper T.B., Mann J.J., & Sublette M.E. (2017). Lipid correlates of antidepressant response to omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation: A pilot study. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 119: 38–44.
- [53] Nemets H., Nemets B., Apter A., Bracha Z., & Belmaker R.H. (2006). Omega-3 treatment of childhood depression: A controlled, double-blind pilot study. *American journal of psychiatry*, 163 (6):1098–1100.
- [54] Freeman M.P., Hibbeln J.R., Wisner K.L., Davis J.M., Mischoulon D., Peet M., Keck P.E. Jr., Marangell L.B., Richardson A.J., Lake J., & Stoll A.L. (2006). Omega-3 fatty acids: Evidence basis for treatment and future research in psychiatry. *Journal of clinical psychiatry*, 67 (12): 1954-67.

- [55] FAO - Joint FAO/WHO Expert Consultation on Fats and Fatty Acids in Human Nutrition (10 - 14 November 2008, WHO, Geneva).
- [56] Cleare A., Pariante C.M., Young A.H., Anderson I.M., Christmas D., Cowen P.J., Dickens C., Ferrier I.N., Geddes J., Gilbody S., Haddad P.M., Katona C., Lewis G., Malizia A., McAllister-Williams R.H., Ramchandani P., Scott J., Taylor D., & Uher R. (2015). Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: A revision of the 2008 British Association for Psychopharmacology guidelines. *Journal of Psychopharmacology*, 29 (5): 459–525.
- [57] Peet M., & Horrobin D.F. (2002). 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*, 59 (10): 913–9.
- [58] Nemets B., Stahl Z., & Belmaker R.H. (2002). Addition of omega-3 fatty acid to maintenance medication treatment for recurrent unipolar depressive disorder. *American journal of psychiatry*, 159 (3): 477–479.
- [59] Huang S.Y., Yang H.T., Chiu C.C., Pariante C.M., & Su K.P. (2008). Omega-3 fatty acids on the forced-swimming test. *Journal of Psychiatric Research*, 42 (1): 58-63.
- [60] Shaldubina A., Nemets B., & Bersudsky Y. (2002). Lack of effect of eicosapentaenoic acid in the Porsolt forced swimming test model of depression. *Acta Neuropsychiatrica*, 14 (5): 203-6.
- [61] Calder P.C. (2017). Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochemical society transactions*, 45: 1105–1115.
- [62] Boche D., Perry V.H., & Nicoll J.A. (2013). Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and applied neurobiology*, 39 (1): 3-18.
- [63] Orihuela R., McPherson C.A., & Harry G.J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British journal of pharmacology*, 173: 649–665.
- [64] De Smedt-Peyrusse V., Sargueil F., Moranis A., Harizi H., Mongrand S., & Layé S. (2008). Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization. *Journal of neurochemistry*, 105 (2): 296–307.
- [65] Mancera P., Wappenhans B., Cordobilla B., Virgili N., Pugliese M., Rueda F., Espinosa-Parrilla J.F., & Domingo J.C. (2017). Natural docosahexaenoic acid in the triglyceride form

attenuates in vitro microglial activation and ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice. *Nutrients*, 9 (7): 681.

[66] Inoue T., Tanaka M., Masuda S., Ohue-Kitano R., Yamakage H., Muranaka K., Wada H., Kusakabe T., Shimatsu A., Hasegawa K., & Satoh-Asahara N. (2017). Omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress the inflammatory responses of lipopolysaccharide-stimulated mouse microglia by activating SIRT1 pathways. *Biochimica et biophysica acta*, 1862 (5): 552–560.

[67] Horvath R.J., Nutile-McMenemy N., Alkaitis M.S., & Deleo J.A. (2008). Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *Journal of neurochemistry*, 107 (2): 557-69.

[68] Ajmone-Cat M.A., Lavinia Salvatori M., De Simone R., Mancini M., Biagioni S., Bernardo A., Cacci E., & Minghetti L. (2012). Docosahexaenoic acid modulates inflammatory and antineurogenic functions of activated microglial cells. *Journal of neuroscience research*, 90 (3): 575–587.

[69] Chen S., Zhang H., Pu H., Wang G., Li W., Leak R.K., Chen J., Liou A.K., & Hu X. (2014). n-3 PUFA supplementation benefits microglial responses to myelin pathology. *Scientific reports*, 4: 7458.

[70] Hjorth E., Zhu M., Toro V.C., Vedin I., Palmblad J., Cederholm T., Freund-Levi Y., Faxen-Irving G., Wahlund L.O., Basun H., Eriksdotter M., & Schultzberg M. (2013). Omega-3 fatty acids enhance phagocytosis of Alzheimer's disease -Related amyloid-42 by human microglia and decrease inflammatory markers. *Journal of Alzheimer's disease*, 35 (4): 697–713.

[71] Heras-Sandoval D., Pedraza-Chaverri J., & Pérez-Rojas J.M. (2016). Role of docosahexaenoic acid in the modulation of glial cells in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 13: 61.

[72] Zhang D., & Leung P.S. (2014). Potential roles of GPR120 and its agonists in the management of diabetes. *Drug design, development and therapy*, 8: 1013–1027.

[73] Milligan G., Alvarez-Curto E., Hudson B.D., Prihandoko R., & Tobin A.B. (2017). FFA4/GPR120: Pharmacology and therapeutic opportunities. *Trends in pharmacological sciences*, 38 (9): 809–821.

[74] Sánchez-Reyes O.B., Romero-Ávila M.T., Castillo-Badillo J.A., Takei Y., Hirasawa A., Tsujimoto G., Villalobos-Molina R., & García-Sáinz J.A. (2014). Free fatty acids and protein

kinase C activation induce GPR120 (free fatty acid receptor 4) phosphorylation. *European journal of pharmacology*, 723: 368-74.

[75] Ling-Ling H., Chien-Hua W., Tzu-Ling L., Shih-Dar C., Li-Chun L., Ching-Ping C., Chiung-Tong C., Keng-Chen L., Ing-Kang H., Wei-Shiung Y., & Lih-Chu C. (2010). Sex differences in high-fat diet-induced obesity, metabolic alterations and learning, and synaptic plasticity deficits in mice. *Obesity*, 18(3): 463-469.

[76] Ferraz A.C., Delattre A.M., Almendra R.G., Sonagli M., Borges C., Araujo P., Andersen M.L., Tufik S., & Lima M.M. (2011). Chronic w-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognition and depression-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. *Behavioural Brain Research*, 219 (1): 116-22.

[77] The Jackson Laboratory, B6.129P2(Cg)-Cx3cr1^{tm2.1(cre/ERT2)Litt}/WganJ.

[78] Parkhurst C.N., Yang G., Ninan I., Savas J.N., Yates J.R., Lafaille J.J., Hempstead B.L., Littman D.R., & Gan W.B. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through BDNF. *Cell*, 155 (7): 1596–1609.

[79] Guan C., Ye C., Yang X., & Gao J. (2010). A review of current large-scale mouse knockout efforts. *Genesis*, 48 (2): 73–85.

[80] Wolf Y., Yona S., Kim K.W., & Jung S. (2013). Microglia, seen from the CX₃CR1 angle. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7: 26.

[81] Chen J., Du Y., He X., Huang X., & Shi Y.S. (2017). A convenient Cas9-based conditional knockout strategy for simultaneously targeting multiple genes in mouse. *Scientific reports*, 7: 517.

[82] El-Brolosy M.A., & Stainier D.Y.R. (2017). Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLOS Genetics*, 13(7): e1006780.

[83] Roy J., Futlon S., & Alquier T. Primary microglia isolation from mixed cell cultures of neonatal mouse brain tissue. [Article en cours de préparation, non publié].

[84] Fenton J.I., Hord N.G., Ghosh S., & Gurzell E.A. (2013). Long chain omega-3 fatty acid immunomodulation and the potential for adverse health outcomes. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 89(6): 379–390.

[85] Li X., Yu Y., & Funk C.D. (2013). Cyclooxygenase-2 induction in macrophages is modulated by docosahexaenoic acid via interactions with free fatty acid receptor 4 (FFA4). *The FASEB journal*, 27 (12): 4987-97.

- [86] Van Loo G., Sze M., Bougarne N., Praet J., Mc Guire C., Ullrich A., Haegeman G., Prinz M., Beyaert R., & De Bosscher K. (2010). Anti-inflammatory properties of a plant-derived nonsteroidal, dissociated glucocorticoid receptor modulator in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Molecular endocrinology*, 24: 310–322.
- [87] Zhang Z., Zhang Z.Y., & Schluesener H.J. (2009). Compound A, a plant origin ligand of glucocorticoid receptors, increases regulatory T cells and M2 macrophages to attenuate experimental autoimmune neuritis with reduced side effects. *Journal of immunology*, 183: 3081–3091.
- [88] Pærregaard S.I., Agerholm M., Serup A.K., Ma T., Kiens B., Madsen L., Kristiansen K., & Jensen B.A. (2016). FFAR4 (GPR120) signaling is not required for anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects of omega-3 fatty acids. *Mediators of inflammation*, 2016: 1536047.
- [89] Bjursell M., Xu X., Admyre T., Böttcher G., Lundin S., Nilsson R., Stone V.M., Morgan N.G., Lam Y.Y., Storlien L.H., Lindén D., Smith D.M., Bohlooly-Y M., & Oscarsson J. (2014). The beneficial effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on diet induced obesity and impaired glucose control do not require Gpr120. *PLOS one*, 9 (12): e114942.
- [90] Oh D.Y., & Walenta E. (2014). Omega-3 fatty acids and FFAR4. *Frontiers in endocrinology (Lausanne)*, 5: 115.
- [91] Quesada-López T., Cereijo R., Turatsinze J.V., Planavila A., Cairó M., Gavaldà-Navarro A., Peyrou M., Moure R., Iglesias R., Giralt M., Eizirik D.L., & Villarroya F. (2016). The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes. *Nature communications*, 7: 13479.
- [92] Ghandour R.A, Colson C., Giroud M., Maurer S., Rekima S., Ailhaud G., Klingenspor M., Amri E-Z., & Pisani D.F. (2018). Impact of dietary ω 3 polyunsaturated fatty acid supplementation on brown and brite adipocyte function. *The journal of lipid research*, 59 (3): 452-461.