

Université de Montréal

**La fonction protectrice des acides gras oméga-3 dans la  
neuroinflammation et les comportements anxio-dépressifs  
induits par l'obésité et l'implication du récepteur GPR120**

par Geneviève Demers

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

Janvier 2019

© Geneviève Demers, 2019

# Résumé

**Introduction:** L'obésité peut provoquer un statut pro-inflammatoire dans plusieurs régions du cerveau, incluant le noyau accumbens (NAc), impliquées dans le contrôle des comportements anxio-dépressifs. Les acides gras polyinsaturés oméga-3 (n-3) diminuent les symptômes de dépression majeure et peuvent inhiber l'inflammation métabolique. GPR120 est un récepteur couplé à la protéine G qui est activé par les n-3. En périphérie, GPR120 est impliqué dans la résolution de l'inflammation au sein des macrophages.

**Hypothèse:** Une supplémentation en n-3 améliore les comportements anxio-dépressifs de même que des paramètres métaboliques et inflammatoires altérés par une obésité induite par la diète, et ce, entre autres, via l'implication de GPR120.

**Objectifs principaux:** Mesurer les effets d'une supplémentation chronique en n-3 en contexte d'obésité sur des paramètres métaboliques, comportementaux et inflammatoires de même que de décrire les effets anti-inflammatoires de l'activation microgliale de GPR120.

**Méthodes:** Dans la première étude, des souris C57Bl/6 ont été nourries avec une diète riche en gras saturés ou une diète contrôle pour ensuite être gavées quotidiennement avec des huiles de poisson ou de maïs. Des mesures comportementales, métaboliques et inflammatoires ainsi qu'une quantification des neurolipides ont été effectuées. Dans la deuxième étude, l'expression de GPR120 a été évaluée dans plusieurs types cellulaires cérébraux. Des marqueurs inflammatoires ont été mesurés dans des cultures microgliales primaires de souris exposées à un agent pro-inflammatoire, le lipopolysaccharide (LPS), et à un agoniste spécifique de GPR120 (cpdA). Des traitements semblables ont été administrés *in vivo* afin d'étudier leurs effets sur les comportements de type anxieux.

**Résultats:** La supplémentation en n-3 a amélioré les comportements de type anxieux, le déficit exploratoire, l'intolérance au glucose et les modulations de la lipidomique cérébrale induits par la diète riche en gras. Nous avons rapporté l'expression de GPR120 principalement dans la microglie et le cpdA a diminué l'expression et la

sécrétion de marqueurs pro-inflammatoires induites par le LPS dans la microglie. Le traitement avec le cpdA *in vivo* a également amélioré les comportements de maladie démontrés par une résolution de la diminution locomotrice engendrée par le LPS. Ces résultats démontrent les effets bénéfiques comportementaux et anti-inflammatoires des n-3 en contexte d'obésité et suggèrent que l'activation microgliale de GPR120 médie ces effets.

**Mots-clés:** Acides gras n-3, neuroinflammation, obésité, GPR120, comportements anxio-dépressifs.

## Abstract

**Introduction:** Obesity can elicit cerebral inflammation, including in the nucleus accumbens (NAc), a brain region involved in the control of anxio-depressive behaviors. Omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3) reduce symptoms of major depression and may inhibit metabolic inflammation. GPR120 is a G-protein coupled receptor activated by n-3. Peripherally, GPR120 is involved in the resolution of inflammation within macrophages.

**Hypothesis:** N-3 supplementation improves anxio-depressive behaviors as well as metabolic and inflammatory parameters altered by diet-induced obesity through the involvement of GPR120.

**Objectives:** To measure the effects of a chronic n-3 supplementation in a context of obesity on metabolic, behavioral and inflammatory parameters as well as to describe the anti-inflammatory effects of GPR120 microglial activation.

**Methods:** In the first study, C57Bl/6 mice were submitted to a high-fat or control diet and then gavaged daily with fish oil or corn oil. Behavioral, metabolic, inflammatory markers, as well as neurolipids measurements were performed. In the second study, GPR120 expression was assessed in several brain cell types. Inflammatory markers expression was measured in mouse primary microglia cultures exposed to a pro-inflammatory agent, the lipopolysaccharide (LPS) and a GPR120 specific agonist (cpdA). Similar treatments were administered *in vivo* to study their impact on anxiety-like behaviors.

**Results:** Chronic n-3 supplementation improved anxiety-like behavior, exploratory deficit, glucose intolerance, and cerebral lipidomic modulations induced by a high-fat diet. We reported that the expression of GPR120 primarily in microglia and cpdA decreased the expression and secretion of pro-inflammatory markers induced by LPS in microglia. Treatment with cpdA *in vivo* also improved sickness behaviors demonstrated by the resolution of locomotor deficit caused by LPS. These results demonstrate the behavioral and anti-inflammatory benefits of n-3 in the context of obesity and suggest that GPR120 microglial activation mediates these effects.

**Keywords:** Omega-3 fatty acids, neuroinflammation, obesity, GPR120, anxiodepressive behaviors.

# Table des matières

La fonction protectrice des acides gras oméga-3 dans la neuroinflammation et les comportements anxio-dépressifs induits par l'obésité et l'implication du récepteur GPR120.....	
Résumé .....	i
Abstract .....	iii
Table des matières .....	v
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements .....	xi
Chapitre 1: Introduction .....	1
1.1. Obésité et les troubles anxieux et dépressifs .....	1
1.1.1. Définition de l'obésité .....	1
1.1.2. Définition de troubles anxieux et dépressifs .....	3
1.1.3. Mécanismes expliquant l'association entre l'obésité et les troubles dépressifs .....	4
1.2. Neuroinflammation .....	5
1.2.1. Généralités .....	5
1.2.2. Conséquences comportementales de la neuroinflammation induite par l'obésité .....	6
1.3. Les acides gras oméga-3 .....	9
1.3.1. Généralités .....	9
1.3.2. Sources alimentaires .....	10
1.3.3. Apports recommandés.....	11
1.3.4. Rôles physiologiques.....	11
1.3.5. Effets bénéfiques des n-3 sur le syndrome métabolique .....	12
1.3.6. Effets bénéfiques des n-3 sur les comportements anxieux et dépressifs .....	14
1.3.7. Composition lipidique du cerveau.....	18
1.4. GPR120 .....	19
1.4.1. Classification et structure.....	19

1.4.2. Rôles métaboliques et anti-inflammatoires .....	21
1.4.3. Mécanisme anti-inflammatoire .....	22
1.5. Hypothèses et objectifs de recherche .....	25
1.6. Contribution aux articles.....	25
Chapitre 2: Article 1 (non publié).....	26
Omega-3 fatty acid supplementation defends against metabolic, angiogenic and neurolipid consequences of a saturated high-fat diet .....	26
Introduction .....	30
Methods .....	32
Results .....	36
Discussion .....	39
References .....	43
Figure Legend.....	55
Chapitre 3: Article 2 (non publié).....	57
Microglial GPR120 activation protects against neuroinflammation and associated behavioral alterations .....	57
Introduction .....	60
Methods .....	62
Results .....	69
Discussion .....	71
Conclusion .....	74
References .....	75
Figure Legend.....	86
Chapitre 4: Discussion.....	88
Chapitre 5: Références.....	97

## Liste des figures

Figure 1. Mécanismes neurobiologiques communs à l'obésité et la dépression (adapté de Ouakinin et coll. 2018[17]).....	5
Figure 2. Représentation d'un labyrinthe en croix surélevé standard (EPM; de l'anglais <i>elevated-plus maze</i> )(d'après Sweis et coll.[29]) .....	8
Figure 3. Représentation du test de la nage forcée (FST; de l'anglais forced swim test)[31].....	9
Figure 4. Critères diagnostiques du syndrome métabolique (adapté de la FID, 2006[57]).....	13
Figure 5. Représentation d'un <i>light/dark box</i> (LDB)[69] .....	15
Figure 6. Diagramme de type snake-plot (d'après Moniri, 2016)[112]. .....	20
Figure 7. Schéma du mécanisme anti-inflammatoire de GPR120 dans un macrophage (adapté de Oh et coll., 2010[115] et Zhang, 2014[110]). .....	24



## Liste des abréviations

ALA: *Alpha-linolenic acid*  
AS: Apport suffisant  
BBB: *Blood–brain barrier*  
CpdA: *Compound A*  
CRF: *Corticotropin-releasing factor*  
CRP: *C-reactive protein*  
CX<sub>3</sub>CR1: *CX3C chemokine receptor 1*  
DHA: *Docosahexaenoic acid*  
EPA: *Eicosapentaenoic acid*  
EPM: *Elevated-plus maze*  
FFA4: *Free-fatty acid receptor-4*  
FO: *Fish oil*  
FST: *Forced swim test*  
GPCR: *G-protein coupled receptor*  
GPR120: *G-protein coupled receptor 120*  
HFD: *High fat diet*  
HPA: *Hypothalamic–pituitary–adrenal*  
Iba1: *Ionized calcium-binding adapter molecule 1*  
IKK: *IκB kinase*  
IL-1β: *Interleukine 1 bêta*  
IL-6: *Interleukine 6*  
IMC: *Indice de masse corporelle*  
JNK: *c-Jun N-terminal kinase*  
KO: *Knock-out*  
LPS: *Lipopolysaccharide*  
MDD: *Major depressive disorder*  
n-3: *Acides gras polyinsaturés oméga-3*  
NAc: *Noyau accumbens*  
NFκB: *Nuclear factor-kappa B*

OFT: *Open field test*  
OLM: *Object location memory*  
ORM: *Object recognition memory*  
PPAR $\gamma$ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*  
PUFA: *Polyunsaturated fatty acid*  
SNC: *Système nerveux central*  
TAB1: *Transforming growth factor- $\beta$  activated kinase 1-binding protein*  
TAK1: *Transforming growth factor- $\beta$  activated kinase 1*  
TLR4: *Toll-like receptor 4*  
TNF- $\alpha$ : *Tumor necrosis factor alpha*  
TNRF: *tumor necrosis factor receptor*  
WAT: *White adipose tissue*  
YFP: *Yellow fluorescent protein*

*À Maman, Papa, Momon et Tony pour votre support inconditionnel*

## Remerciements

J'aimerais d'abord et avant tout remercier ma directrice de recherche, Stephanie Fulton, de même que Thierry Alquier pour leur support constant à travers cette aventure. Dans les bons comme dans les moins bons moments, vous avez su trouver les bons mots pour m'encourager à continuer et à persévérer. Non seulement cette maîtrise a été une expérience professionnelle des plus enrichissantes, mais elle le fut également du point de vue personnel. Merci du fond du cœur, j'ai énormément appris.

Je souhaiterais profiter de l'occasion pour remercier tous les membres de mon labo qui ont de près ou de loin contribué à cette aventure mémorable. Un merci tout particulier à Arturo Israel Machuca Parra, Alexandre Fisette, Khalil Bouyakdan, Demetra Rodaros, Diane Bairamian et Zahra Dashtehei Pour pour votre aide précieuse à la réalisation de ces deux articles. Merci de m'avoir si bienveillamment transmis vos connaissances et d'avoir fait preuve d'autant de patience à mon égard. Je l'apprécie énormément.

Je tiens à remercier également ma famille, Maman, Papa et Momon. Avoir des gens autour de soi qui s'intéresse à ce que l'on fait, c'est précieux. J'ai de la chance de vous avoir, vous ne savez pas à quel point. Merci d'être là, tout le temps, sans compromis.

Finalement, j'aimerais dire merci à la personne qui partage ma vie, mes joies, mes peines, mes angoisses comme mes défauts. Tony, tu sais et je sais que sans toi, je ne serais pas où j'en suis maintenant. Je t'en serais toujours reconnaissante.

*« Vise la lune et si toutefois tu la manques, tu finiras tout de même parmi les étoiles...  
et les étoiles c'est magnifique! »*

Francine Bélanger

# Chapitre 1: Introduction

## 1.1. Obésité et les troubles anxieux et dépressifs

### 1.1.1. Définition de l'obésité

L'obésité se caractérise par une accumulation anormale ou excessive de tissu adipeux pouvant avoir des conséquences néfastes sur la santé des individus. L'indice de masse corporel (IMC) constitue l'outil standard pour dépister l'embonpoint et l'obésité. La formule de l'IMC se détaille comme suit :

$$\frac{\text{Masse corporelle (en kg)}}{\text{Taille (en m)}^2}$$

Une personne dont l'IMC est en deçà de 18,5 est considérée en insuffisance pondérale. Entre 18,5 et 24,5, l'IMC se catégorise comme « normal ». Au-dessus de 24,5, la personne est considérée en surpoids, et au-dessus de 30, en obésité[1].

Le phénomène de l'obésité à l'échelle planétaire s'est aggravé au courant des dernières décennies. En 1975, l'IMC moyen des hommes et des femmes était de 21,7 et 22,1 kg/m<sup>2</sup> respectivement. En 2014, il était de 24,2 et 24,4 kg/m<sup>2</sup> chez les hommes et les femmes respectivement. Ces chiffres sont alarmants considérant que si la situation reste inchangée, la prévalence de l'obésité à l'échelle populationnelle pourrait atteindre 18% chez les hommes et 21% chez les femmes en 2025[2]. La situation canadienne n'est guère mieux avec un taux de 62% d'embonpoint et environ 25% d'obésité au sein de la population en 2012[3].

L'IMC possède tout de même ses limites en matière d'outil de dépistage de l'obésité. En effet, ce ratio ne prend pas en considération la composition corporelle de l'individu, un facteur qui s'avère déterminant afin de déterminer le risque de maladies cardiométaboliques. Plus précisément, cet outil ne distingue pas la masse grasse viscérale de la graisse sous-cutanée, ainsi que la masse musculaire de la masse adipeuse, ce qui soulève un questionnement face à son efficacité à détecter l'obésité et les complications associées[4,5].

L'étiologie de l'obésité est très complexe, dynamique et multifactorielle. Ce phénomène découle d'une combinaison de plusieurs déterminants en interaction. Selon Egger et Dixon, les maladies chroniques, telle l'obésité, peuvent être expliquées en partie par une prédisposition génétique, mais également par ce que les auteurs appellent des « anthropogènes ». Par définition, il s'agit d'« environnements créés par l'Homme, leurs sous-produits et/ou modes de vie encouragés par ceux-ci, dont certains peuvent nuire à la santé humaine » (Traduction libre). Ces « anthropogènes » suivent l'acronyme NASTIE ODOURS qui correspond à :

1. La nutrition
2. L'activité (ou inactivité) physique
3. Le stress/anxiété/dépression
4. La pathologie induite par la technologie (*Technology-induced-pathology*)
5. Le sommeil inadéquat (*Inadequate sleep*)
6. L'environnement
7. L'occupation
8. La drogue/cigarette/alcool
9. La surexposition ou la sous-exposition au soleil (*Over- and underexposure*)
10. Les relations
11. Les facteurs sociaux (*Social factors*) [6]

Pour en revenir à l'aspect génétique, il est important de mentionner qu'une personne peut, en raison de ses gènes, être prédisposée à l'obésité. En 2015, Locke et coll. ont découvert que la majorité des loci associés à l'IMC se trouve dans le système nerveux central (SNS)[7]. Il n'en reste pas moins que cette prédisposition génétique ne sera exprimée que si cette personne est exposée à un environnement obésogène, dénotant ainsi l'importance de l'environnement dans le développement de l'obésité.

Aussi, il est difficile d'établir l'orientation de la relation entre l'obésité et les différents facteurs de risque « anthropogènes »; sont-ils les causes ou les conséquences de l'obésité? Somme toute, l'obésité est corrélée aux risques de maladies

cardiovasculaires, cancers, diabète, mortalité, diverses limitations physiques de même que des troubles psychologiques[8].

### **1.1.2. Définition de troubles anxieux et dépressifs**

La 5e édition du *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* discrimine les troubles dépressifs et les troubles anxieux en deux classifications distinctes.

Les troubles anxieux se définissent comme une sensation de peur excessive ou une anticipation exagérée d'un danger futur, le tout s'accompagnant de perturbations comportementales importantes. Les personnes qui en souffrent surestiment généralement le danger associé à une situation qui les effraye. Les troubles anxieux diffèrent du stress ou de la peur transitoire normale par leur style cognitif persistant qui alimente l'anxiété. Les troubles dépressifs, pour leur part, constituent un ensemble de conditions psychologiques qui affectent l'humeur. Les symptômes sont multiples et varient d'une personne à l'autre. Ils incluent entre autres une tristesse marquée, une perte d'intérêt général, des changements cognitifs et somatiques, de même qu'un sentiment de vide intérieur[9]. Autant dans le cas des troubles anxieux que dépressifs, les émotions intenses et désagréables perdurent dans le temps en plus de nuire au bien-être, à la santé physique et au fonctionnement global[10]. Ces pathologies sont malheureusement très communes de nos jours dans les sociétés occidentales. En 2012, 12,6% de la population canadienne, soit 3,5 millions de personnes, répondaient à un moment durant leur vie aux critères diagnostiques de troubles de l'humeur. Pour l'anxiété généralisée, ce pourcentage s'élève à 8,7% ou 2,4 millions de Canadiens. Cette prévalence élevée est alarmante non seulement puisqu'elle démontre l'impact négatif de ces maladies sur la santé de la population, mais aussi les répercussions économiques qu'elles représentent. En effet, on peut penser à la perte de productivité et l'absentéisme au travail de même que les soins de santé et chômage réclamés[11]. En revanche, ces deux conditions psychologiques coexistent fréquemment. Il a été démontré que 85% des patients dépressifs souffrent également de troubles anxieux. Inversement, 90% des patients anxieux sont atteints d'un trouble dépressif[12]. Non seulement ces deux pathologies sont comorbides, mais elles pourraient prédisposer

également les personnes qui en souffrent à des maladies cardiovasculaires et au syndrome métabolique, incluant l'obésité[12,13].

### **1.1.3. Mécanismes expliquant l'association entre l'obésité et les troubles dépressifs**

Le surplus pondéral augmente le risque de souffrir de pathologies du système nerveux central (SNC)[14]. Plus précisément, la croissance de l'obésité dans nos populations est concomitante avec l'augmentation de l'incidence de démence, d'accident vasculaire cérébral, d'Alzheimer et de dépression[15]. D'ailleurs, l'obésité augmente le risque de dépression de 55%, et inversement un individu dépressif aura 58% plus de chances de devenir obèse au courant de sa vie[16]. La communauté scientifique s'entend pour dire que la pierre angulaire de ces deux pathologies est la conséquence de l'exposition chronique au stress. Évidemment, la vulnérabilité au stress est très variable d'un individu à l'autre et est influencée par plusieurs facteurs cognitifs, émotionnels et contextuels[17]. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA; de l'anglais *hypothalamic-pituitary-adrenal*) est un système dynamique qui a pour rôle fondamental de protéger l'organisme lorsqu'un danger ou une menace imminente survient. Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus produit et sécrète alors de la corticolibérine (CRF; de l'anglais *corticotropin-releasing factor*) qui atteindra l'hypophyse. La liaison du CRF à son récepteur favorisera la synthèse et le relargage de l'adrénocorticotrophine qui à son tour, atteindra les glandes corticosurrénales. Ceci provoquera la libération de glucocorticoïdes ou cortisol chez l'Humain[18]. Cette activation engendrera la production et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. L'augmentation du tissu adipeux blanc (WAT; de l'anglais *white adipose tissue*) induite par l'obésité favorise aussi l'augmentation de la libération de ces cytokines[17]. L'axe HPA interagit également avec le système nerveux autonome, responsable du maintien de l'homéostasie de l'organisme. En effet, la libération du CRF par l'axe HPA favorisera la libération de monoamine incluant la norépinéphrine qui, à son tour, promeut la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. En outre, l'inflammation systémique



chronique induite par l'obésité perturbe également la neurogenèse et la plasticité neuronale qui, elles, augmentent le risque de dépression (Figure 1)[17].

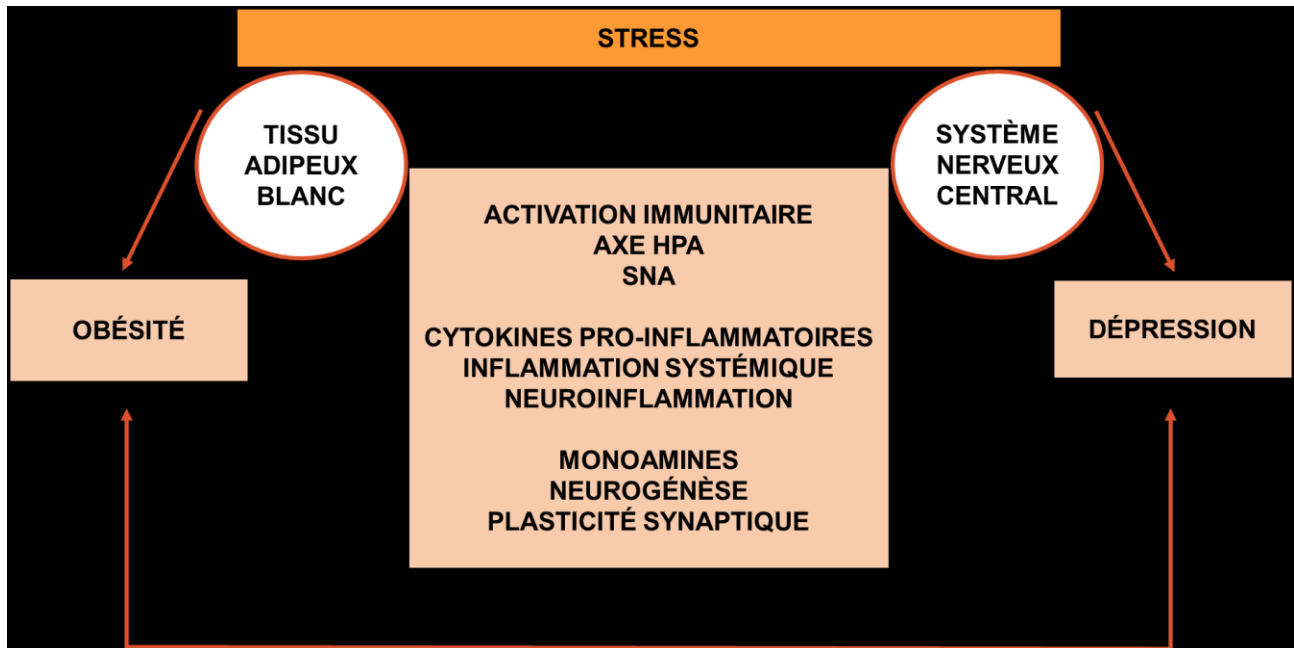


Figure 1. Mécanismes neurobiologiques communs à l'obésité et la dépression (adapté de Ouakinin et coll. 2018[17]).

Quoique l'obésité et la dépression possèdent des étiologies et pathophysiologies différentes, il est bien accepté aujourd'hui qu'ils partagent un point commun: un état pro-inflammatoire chronique, et ce, particulièrement au niveau du SNC[19].

## 1.2. Neuroinflammation

### 1.2.1. Généralités

La neuroinflammation se définit comme l'ensemble des réponses immunitaires dans le SNC[20]. Cet ensemble de réactions a pour objectif de rétablir l'homéostasie en favorisant la régénération des cellules suite à une agression, un traumatisme ou une lésion[21]. Le SNC a longtemps été considéré du point de vue de l'immunité comme privilégié, et ce, pour plusieurs raisons. D'abord, structurellement parlant, le SNC est protégé par la barrière hématoencéphalique (BBB; de l'anglais *blood-brain barrier*), un

bouclier cellulaire entre la circulation sanguine et le parenchyme cérébral, ainsi que par l'absence de drainage lymphatique conventionnel[21]. Ces derniers permettent de limiter la diffusion de molécules et donc de limiter les attaques par des agents pathogènes. C'est d'ailleurs pourquoi certains experts considèrent la neuroinflammation comme de la « pseudo-inflammation » puisque le cerveau n'utilise pas les mêmes processus inflammatoires qu'en périphérie. En effet, le modèle classique d'inflammation implique un mécanisme de recrutement des cellules immunitaires périphériques, ce qui n'est pas le cas du cerveau[22]. Pour pallier ceci, le SNC possède son propre arsenal de cellules participant aux réponses immunitaires, incluant les cellules endothéliales, les astrocytes, les oligodendrocytes ainsi que la microglie[23]. La microglie, étant la cellule immunitaire résidente du cerveau, est au centre des processus de neuroinflammation. À l'état basal, la microglie participe activement à la surveillance de l'équilibre immunitaire du cerveau. Lorsqu'une agression survient, la microglie produira des cytokines, chimokines, des dérivés réactifs de l'oxygène, ainsi que d'autres médiateurs inflammatoires[20].

### **1.2.2. Conséquences comportementales de la neuroinflammation induite par l'obésité**

L'obésité induit la libération en circulation de multiples facteurs pro-inflammatoires, et ce de manière chronique, participant ainsi au phénomène appelé *low-grade inflammation*[24]. Les cytokines atteignent le cerveau où elles causent des perturbations des fonctions cérébrales. Plusieurs évidences démontrent d'ailleurs des altérations comportementales secondaires à la neuroinflammation. Jusqu'à maintenant, la majorité de la recherche à ce sujet est effectuée chez le rongeur. Ces études mesurent généralement ces paramètres sur deux fronts, soit l'apprentissage et la mémoire spatiale ainsi que l'anxiété et la dépression.

D'abord, l'évaluation des capacités cognitives reliées à la mémoire spatiale est principalement effectuée dans les études à l'aide de *l'Object Recognition Memory (ORM)* et de *l'Object Location Memory (OLM) test*. L'ORM consiste à exposer une souris à deux objets identiques dans une boîte fermée durant l'apprentissage du test.

Ensuite, lors de l'expérimentation, un des deux objets sera remplacé par un objet sensiblement similaire sur le plan de la taille et de la forme sans être exactement identique. Plus l'animal explorera ce nouvel objet, plus cela signifie qu'il reconnaît que cet objet est différent, ce qui reflète ses capacités de mémorisation. L'OLM est un test similaire. Par contre, dans ce cas-ci, ce n'est pas l'objet qui est modifié durant l'expérimentation, mais bien la localisation de celui-ci[25]. L'avantage de combiner ces deux tests est que le test de l'ORM est dit indépendant des processus de mémorisation de l'hippocampe, une structure-clé dans les mécanismes cognitifs impliquant l'apprentissage et la mémoire, alors que celui de l'OLM en est dépendant[26]. Il a été démontré que l'exposition chronique à une diète riche en gras chez le rongeur induit des déficits de mémorisation dans le test de l'ORM et de l'OLM[26,27]. Ainsi, l'hippocampe est une région cérébrale sensible à l'obésité avec des niveaux de facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ; de l'anglais *tumor necrosis factor alpha*) et de *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba1), un marqueur d'activation microgliale, augmentés par rapport à ceux de souris soumises à une diète basse en gras[28].

Ensuite, l'anxiété est évaluée chez le rongeur principalement à l'aide du labyrinthe en croix surélevée (EPM; de l'anglais *elevated-plus maze*) et du test du champ ouvert (OFT; de l'anglais *open field test*). Ces deux tests sont basés sur l'aversion instinctive des souris pour les espaces ouverts, par mesure de protection contre les prédateurs. L'EPM est constitué d'une croix surélevée du sol comportant deux bras fermés à l'aide de murs ainsi que de deux bras ouverts exposés (Figure 2). Plus l'animal reste dans les bras fermés durant le test, plus celui-ci est considéré comme anxieux.

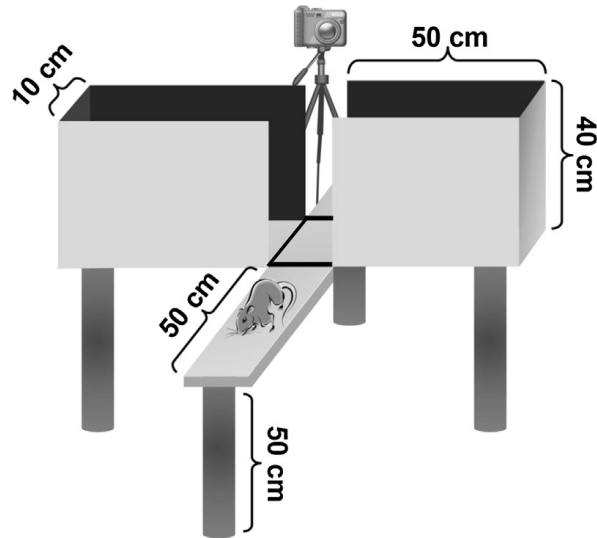


Figure 2. Représentation d'un labyrinthe en croix surélevé standard (EPM; de l'anglais *elevated-plus maze*)(d'après Sweis et coll.[29])

L'OFT, pour sa part, consiste en une boîte fermée où l'animal y est déposé en début de test. La préférence d'un animal à longer les murs par opposition à la section centrale de la boîte est synonyme d'anxiété. Des résultats préalablement publiés par notre laboratoire démontrent que l'obésité induite par une diète riche en gras saturés suscite des comportements anxieux, autant dans l'EPM que dans l'OFT. Cette même recherche a conclu que ces altérations comportementales étaient associées à une augmentation de paramètres inflammatoires dans le noyau accumbens (NAc), une région d'intérêt impliquée dans la motivation et les comportements anxio-dépressifs[30]. Pour ce qui est des comportements dépressifs chez la souris, il semble être plus complexe et nuancé à évaluer. En effet, le test classique utilisé chez les rongeurs est le test de la nage forcée (FST; de l'anglais *forced swim test*) qui mesure un type de comportement s'apparentant au désespoir (Figure 3). Ce test consiste à placer l'animal dans un béccher rempli d'eau et de mesurer l'amplitude et la vigueur avec lesquelles l'animal tente d'échapper à cette situation aversive. Un animal qui exprime des comportements de type dépressif aura tendance à être immobile dans l'eau.

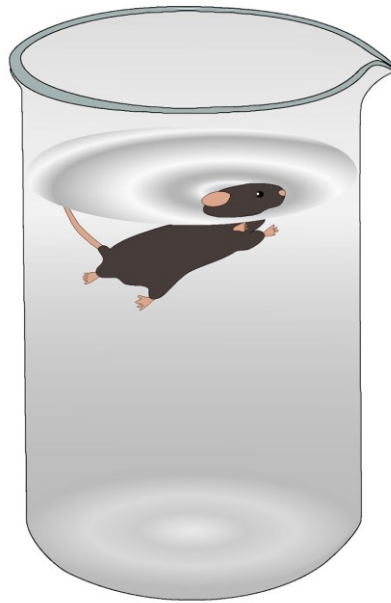


Figure 3. Représentation du test de la nage forcée (FST; de l'anglais *forced swim test*)[31]

L'obésité exacerbe ce type de comportement chez la souris, entre autres en augmentant les taux de cytokines pro-inflammatoires telle l'interleukine 1 bêta (IL-1 $\beta$ ) dans l'amygdale[32]. Cette structure cérébrale, tout comme le NAc, fait partie du système limbique, une interconnexion entre différentes structures cérébrales impliquées dans la modulation des processus émotionnels.

### 1.3. Les acides gras oméga-3

#### 1.3.1. Généralités

Les oméga-3 (n-3) font partie de la famille des acides gras polyinsaturés (PUFA; de l'anglais *polyunsaturated fatty acid*) à chaînes longues qui par définition sont des acides gras comportant un minimum de deux insaturations. Les n-3 se caractérisent par leur premier double lien sur le carbone 3 à partir du groupement méthyle de la chaîne carbonée[33]. Il existe plusieurs types d'acides gras n-3, dont l'acide alpha linoléique (ALA; de l'anglais *alpha-linolenic acid*), l'acide eicosapentaénoïque (EPA; de l'anglais *eicosapentaenoic acid*) et l'acide docosahexaénoïque (DHA; de l'anglais

*docosahexaenoic acid*). L'EPA et le DHA sont considérés comme les acides gras n-3 les plus actifs biologiquement chez l'être Humain[34].

L'Humain peut synthétiser tous les types d'acides gras nécessaires au bon fonctionnement des fonctions biologiques à l'exception des acides gras à chaînes longues n-3 et oméga-6 (n-6) [35]. En effet, l'ALA est considéré comme un acide gras essentiel puisqu'il ne peut être synthétisé à partir d'aucun autre acide gras, en raison de l'absence de désaturase qui insère un double lien au carbone en position 15. Il est donc essentiel de se procurer cet acide gras dans l'alimentation. L'ALA peut, par contre, être convertie en EPA et subséquemment en DHA[36]. Quoiqu'il en soit, plusieurs critiquent cette allégation en dénotant le taux de conversion très faible de l'ALA en EPA et puis en DHA[37]. Par ailleurs, il semble qu'il y ait un dimorphisme sexuel important à ce niveau. Les femmes convertiraient l'ALA en EPA et en DHA à un taux de 21% et 9.2% respectivement. Pour leur part, les hommes le convertiraient à un taux de 8% et 4% pour l'EPA et le DHA respectivement[38]. C'est pourquoi il est nécessaire de consommer régulièrement des aliments riches en EPA et en DHA afin d'atteindre un apport optimal [37].

### **1.3.2. Sources alimentaires**

L'ALA est présente majoritairement dans les huiles végétales, les noix, la graine de lin et les produits dérivant du soya[39], ce qui en fait l'acide gras n-3 prédominant dans l'alimentation des Nord-Américains[40]. L'EPA et le DHA se retrouvent principalement dans les aliments d'origine marine. Plus précisément, l'huile dérivée du krill et des algues sont les plus riches en EPA et DHA[41]. Les poissons pélagiques d'eau froide tel le saumon, la sardine et le hareng sont également d'excellentes sources de ces n-3. En revanche, il est maintenant connu que la teneur en acides gras de ces poissons varie grandement selon la localisation géographique, la période de l'année où ils sont pêchés, ainsi que l'alimentation des poissons eux-mêmes. En effet, les poissons issus de pisciculture, mangeant une diète à contenu constant en n-3, auront une teneur en n-3 beaucoup plus stable tout au long de l'année comparativement aux poissons sauvages. D'importantes variations dans le contenu en EPA et DHA des suppléments

sous forme de capsule ont également été observées[34]. Cette variabilité complique l'évaluation de l'apport exact en ces acides gras auprès de la population à l'aide de méthodes traditionnelles telles que le rappel de 24 heures ou le questionnaire de fréquence alimentaire.

### **1.3.3. Apports recommandés**

Santé Canada a déterminé un apport recommandé journalier pour l'ALA. Il s'agit d'un apport suffisant (AS) fixé à 1,6 g/jour et à 1,1 g/jour pour les hommes et les femmes de plus de 14 ans respectivement[42]. Cette recommandation est critiquée puisqu'il s'agit d'un AS, valeur établie lorsque les données scientifiques sont insuffisantes pour déterminer un apport de nutritionnel recommandé. Pour être plus précis, «L'AS est l'apport quotidien moyen recommandé en s'appuyant sur des observations, des expérimentations ou des estimations approximatives de l'apport nutritionnel chez un ou plusieurs groupes de personnes apparemment en bonne santé qui semblent conserver un statut nutritionnel adéquat»[43]. Donc, cette évaluation des besoins pourrait être inexacte dans certaines situations dues au manque de données probantes pour établir une recommandation précise selon l'âge, le sexe et l'état de santé par exemple. Au niveau des apports journaliers en EPA et DHA, les grandes instances gouvernementales incluant l'Organisation mondiale de la santé, l'Association américaine de diététique ainsi que les diététistes du Canada s'entendent pour recommander une consommation de deux portions de poissons gras par semaine, équivalant approximativement à 500 mg d'EPA et de DHA par jour[40,44].

### **1.3.4. Rôles physiologiques**

Les n-3 possèdent de multiples rôles variés au sein de divers systèmes. Entre autres, les n-3 entrent dans la composition des phospholipides présents dans les membranes cellulaires. Celle-ci varie grandement en fonction du type de cellules et de son emplacement. Le DHA est davantage intégré dans les membranes cellulaires que l'EPA, et ce, majoritairement au sein des cellules cérébrales et de la rétine[41,45]. La composition membranaire est également influencée par l'apport alimentaire. En effet,

il a été démontré qu'une supplémentation en n-3, et plus spécifiquement en DHA, augmente la fluidité membranaire[46,47]. D'ailleurs, la fluidité membranaire est essentielle à l'expansion des membranes cellulaires, démontrant l'importance des n-3, en particulier le DHA, lors du développement neuronal[48]. L'intégration des n-3 dans cette structure influence aussi les mécanismes de signalisation intracellulaire, l'activation et la formation des récepteurs transmembranaires, l'épaisseur de même que la perméabilité de la membrane[35,48]. Aussi, les n-3 jouent un rôle crucial dans la réduction de l'inflammation. Entre autres, l'augmentation de l'apport en n-3 favoriserait la biosynthèse de médiateurs anti-inflammatoires, au détriment de ceux dérivés des n-6 pro-inflammatoires, puisque ces deux types d'acides gras partagent les mêmes enzymes de conversion[49]. De multiples évidences ont aussi démontré l'effet des n-3 sur les niveaux circulants de molécules pro-inflammatoires telles les interleukines 6 (IL-6), d'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ainsi que la protéine C réactive (CRP; de l'anglais *C-reactive protein*) [50–52]. Dans le même ordre d'idée, les n-3 bloquent la cascade d'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire *nuclear factor-kappa B* (NF $\kappa$ B), qui lui-même promeut l'expression de cytokines pro-inflammatoires[53]. Les n-3 ont également démontré des effets bénéfiques au niveau du développement fœtale[54], de la fonction visuelle[55] et immunitaire[35,56].

### **1.3.5. Effets bénéfiques des n-3 sur le syndrome métabolique**

Selon la Fédération internationale de diabète, le syndrome métabolique est une combinaison des facteurs de risques cardiaques les plus nocifs pour la santé[57] et la synergie entre eux potentialise leurs effets délétères. Les critères diagnostiques de cette condition sont détaillés à la figure 4.



<b>Définition du syndrome métabolique selon la Fédération international de diabète (FID)</b>	
Selon la FID, pour qu'une personne soit définie comme ayant le syndrome métabolique, elle doit absolument avoir:	
<b>Obésité abdominale</b> (définie par la tour de taille, incluant des spécificités ethniques)	
En plus d'au moins deux des facteurs suivants:	
<b>Triglycéridémie élevée</b>	>150 mg/dL (1,7 mmol/L) <b>Ou suivant un traitement pour cette anomalie lipidique</b>
<b>Cholestérol HDL réduit</b>	< 40 mg/dL (1,03 mmol/L) pour les hommes < 50 mg/dL (1,29 mmol/L) pour les femmes <b>Ou suivant un traitement pour cette anomalie lipidique</b>
<b>Pression artérielle élevée</b>	Pression systolique ≥ 130 ou pression diastolique ≥ 85 mm Hg <b>Ou suivant un traitement pour une hypertension déjà diagnostiquée</b>
<b>Glycémie à jeun élevée</b>	≥ 100 mg/dL (5,6 mmol/L) <b>Ou étant préalablement diagnostiqué avec le diabète de type 2</b>

Figure 4. Critères diagnostiques du syndrome métabolique (adapté de la FID, 2006[57])

Les effets bénéfiques des n-3 sur la santé cardiométabolique ont fait l'objet de recherche extensive depuis 60 ans. Hugh Macdonald Sinclair, en 1953, a été l'un des premiers à observer la basse prévalence de maladies cardiovasculaires chez les Inuits du Grand Nord canadien malgré l'apport élevé en gras provenant des produits de la mer[58]. Par la suite, en 1976, des chercheurs danois ont mis en évidence les hautes concentrations en n-3 présentes dans leur sang d'Inuits du Groenland en plus de discuter des effets bénéfiques des acides gras polyinsaturés sur la santé cardiovasculaire[59]. Depuis, plusieurs essais contrôlés randomisés ont confirmé l'effet protecteur des n-3 entre autres sur la réduction des taux circulants de triacylglycérol[60–62]. Pour leur part, les n-3 auraient un effet mitigé ou nul chez l'Humain sur les taux sanguins de lipoprotéines à haute densité et sur la pression artérielle[63]. Dans le cas de l'homéostasie glucidique, des études chez l'animal démontrent clairement les effets positifs des n-3. Ces acides gras sont connus pour être des agonistes et des activateurs du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes nucléaires (PPAR $\gamma$ ; de l'anglais *peroxisome proliferator-activated*

*receptor gamma*). Ce récepteur s'exprime principalement dans les adipocytes où son activation favorise l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, améliorant ainsi la tolérance au glucose[64,65]. Chez l'Humain, les bienfaits des n-3 sur la sensibilité au glucose restent incertains et nécessitent davantage de recherche[63]. Il n'en reste pas moins que les effets anti-inflammatoires connus des n-3 pourraient moduler la *low-grade inflammation* induite par l'obésité, et donc indirectement contribuer à l'amélioration de certains paramètres métaboliques.

### **1.3.6. Effets bénéfiques des n-3 sur les comportements anxieux et dépressifs**

Une des premières études à adresser l'impact des n-3 sur les comportements anxieux remonte à 1995. L'équipe de Francès et coll. a soumis des femelles gestantes de même que leurs progénitures mâles et femelles à une diète déficiente ou adéquate en ALA. Ils n'ont dénoté, tout comme Belzung et coll., aucune différence significative des comportements anxiogènes ni dans l'EPM ni dans le test du *light/dark box* (LDB)[66,67]. Ce test mesure les comportements de type anxieux en utilisant l'aversion naturelle des souris pour les espaces ouverts (Figure 5). Il consiste à exposer une souris à une boîte divisée en deux compartiments : l'un est éclairé et ouvert, l'autre est fermé et sombre. Les deux compartiments communiquent entre eux par une petite ouverture. Plus un animal est anxieux, plus il tentera d'éviter le compartiment clair pour se réfugier dans le compartiment sombre[68].



Figure 5. Représentation d'un *light/dark box* (LDB)[69]

Plus tard, en 2000, Carrié et coll. ont soumis des femelles gestantes à une diète déficiente ou adéquate en ALA. Les souris de la deuxième génération ont été nourries après sevrage avec la même diète que leur mère. À l'âge de 7 semaines, les souris nourries à la diète déficiente en ALA ont été soumises à une diète enrichie en n-3 provenant de jaune d'œuf ou de phospholipides de cerveaux de porc, ces deux dernières étant riches en DHA. Cette équipe a découvert un important effet anxiolytique des diètes supplémentées en n-3 dans l'EPM et l'OFT comparativement au groupe nourri de la diète déficiente en ALA[70]. Toutefois, il est important de dénoter l'importante réduction de concentration cérébrale en n-3 observée chez les souris déficientes, ce qui pourrait expliquer les effets comportementaux bénéfiques observés. Dans les années qui ont suivi, plusieurs autres équipes de recherche utilisant des approches variées ont démontré les effets bénéfiques des n-3 sur l'anxiété chez le rongeur[71,72].

Parallèlement, d'autres chercheurs ont étudié l'impact des n-3 sur les comportements de type dépressifs chez le rongeur. Comme mentionné précédemment, le test de la

nage forcée (FST) est l'expérience la plus fréquemment utilisée en recherche pour étudier les comportements de type dépressif chez le rongeur. En 2008, Venna et coll., à l'aide de ce même test, ont remarqué une réduction significative de l'immobilité des animaux suivant une diète enrichie en n-3 durant six semaines. Cette équipe a obtenu un résultat semblable en administrant une dose journalière très élevée (2,5 g/kg) d'n-3 aux animaux pour six semaines[73]. Certains auteurs ont argumenté que cet effet serait majoritairement dû à l'effet du DHA et non de l'EPA. Par ailleurs, Huang et coll. ont démontré une diminution de l'immobilité dans le FST suite à une diète fort différente en termes d'acides gras n-3, soit 36,80% pour la diète expérimentale contre 0,39% pour la diète contrôle, durant six semaines. Par contre, ils ont également observé que cette diminution corrèle inversement avec une augmentation du DHA cérébral, mais pas de l'EPA[74]. Ces résultats sont appuyés par ceux rapportés précédemment par Shaldubina et coll., en 2002, qui ont démontré l'inefficacité d'un traitement aigu d'EPA injecté à diverses concentrations à diminuer le temps d'immobilité dans le FST. Néanmoins, plusieurs autres études publiées subséquemment ont démontré non seulement l'efficacité des n-3 à améliorer les comportements de type dépressif chez le rongeur, mais aussi à potentialiser les effets des antidépresseurs classiques tels que la fluoxétine[75,76]. Il est toutefois important de mentionner que, bien qu'il soit très présent dans la littérature, le FST reste très critiqué par plusieurs auteurs[77,78]. Ceux-ci argumentent que l'immobilité des animaux, classiquement interprétée comme un comportement de désespoir, serait en fait une stratégie adaptative à une situation stressante.

La plupart des recherches cliniques interventionnelles sur les n-3 et les troubles de l'humeur sont relativement nouvelles et portent principalement sur la dépression. L'anxiété est souvent un résultat secondaire de ces recherches et à ce sujet, les études démontrent des résultats controversés dépendamment des populations étudiées. En effet, plusieurs recherches ont documenté l'inefficacité d'un traitement aux n-3 sur l'anxiété chez les personnes âgées[79], les enfants et les adolescents souffrant de troubles du comportement alimentaire[80] ainsi que chez les femmes ménopausées[81]. Ces trois études ont d'ailleurs utilisé une dose d'EPA et de DHA se rapprochant de la recommandation des diététistes du Canada, soit 500 mg d'EPA et

DHA par jour[40], qui s'avère être peu élevée comparativement à celles utilisées dans plusieurs études animales. D'un autre côté, des équipes de recherche ont démontré leur efficacité sur l'anxiété secondaire au syndrome prémenstruel[82], chez les alcooliques abstinents[83], chez les personnes souffrant de toxicomanie[84], de même que chez les étudiants en médecine n'ayant pas d'antécédents d'anxiété[85]. Ces deux dernières études ont toutefois utilisé des doses très élevées d'EPA et de DHA, soit environ cinq fois la recommandation canadienne journalière.

Pour ce qui est de la dépression, une méta-analyse d'essais randomisés contrôlés a été publiée en 2014 analysant l'efficacité d'un traitement aux n-3 chez les personnes souffrant de troubles dépressifs majeurs (MDD; de l'anglais *major depressive disorder*) et souffrant de symptômes dépressifs sans diagnostic de MDD[86]. Ils ont montré qu'une supplémentation en n-3 est efficace pour réduire les symptômes dépressifs chez les personnes diagnostiquées MDD et chez celles souffrant de symptômes dépressifs, mais non diagnostiqués. Elle est aussi efficace pour traiter les comportements dépressifs chez les personnes souffrant de bipolarité. À l'inverse, une supplémentation en n-3 est inefficace pour traiter les symptômes dépressifs chez les femmes enceintes, les gens ayant des maladies cardiovasculaires, les gens souffrant de schizophrénie, d'Alzheimer et autres troubles cognitifs de même que chez les femmes souffrant de dépression post-partum. Fait intéressant, ils ont démontré que la supplémentation en n-3 est inefficace pour prévenir l'apparition de symptômes dépressifs chez les individus sains. Contrairement à ce qui a été observé chez les animaux, cette équipe a découvert que l'efficacité des n-3 dans le traitement de la dépression chez l'Humain repose davantage sur l'EPA que sur le DHA.

Les résultats de toutes ces études antérieures démontrent que ce sujet est encore mal compris et que davantage de recherches standardisées sont nécessaires. En effet, il est difficile de comparer les résultats des études, autant chez l'animal que chez l'Humain, puisque ceux-ci peuvent être grandement influencés par de multiples variables confondantes. On pense, entre autres, au manque de rigueur dans les méthodes d'évaluation nutritionnelle[87], de l'hétérogénéité des outils d'évaluation des symptômes anxio-dépressifs[88] ainsi que de la durée, dose et types d'acides gras administrés[89]. Ces deux derniers points sont d'ailleurs des raisons qui ont motivé

notre équipe à développer le protocole de recherche de l'article 1, en utilisant des doses d'EPA et de DHA chez la souris qui sont proportionnelles à ce qui est utilisé chez l'Humain.

### **1.3.7. Composition lipidique du cerveau**

Le rôle essentiel des PUFA au niveau du cerveau a été largement étudié dans les dernières décennies. L'étude de la composition lipidique du cerveau remonte aux années 60[90]. Durant les années qui ont suivi, plusieurs équipes ont étudié l'effet d'une déficience en ALA et comment celle-ci altère drastiquement non seulement la composition en acides gras, mais aussi les fonctions du cerveau[91,92]. Nous savons aujourd'hui que le système nerveux possède la plus grande concentration de lipides après le tissu adipeux. D'ailleurs, dans le cerveau, un tiers des acides gras sont polyinsaturés[93]. Plus spécifiquement, les membranes des cellules nerveuses sont majoritairement formées de deux acides gras polyinsaturés : un n-6, l'acide arachidonique et un n-3, le DHA[94]. Le DHA est l'acide gras le plus prédominant dans le cerveau [48,95]. Les autres n-3 sont très peu présents dans le cerveau. Par exemple, l'EPA y est présent à une concentration environ 275 fois inférieure au DHA[96]. Une des hypothèses principales qui expliquerait cette faible concentration porterait sur la  $\beta$ -oxydation rapide de l'EPA comparativement au DHA, présent davantage dans les membranes cellulaires[97]. La synthèse endogène d'EPA et de DHA au niveau du cerveau serait relativement faible[97]. Leurs concentrations cérébrales sont grandement influencées par la teneur de la diète en ces mêmes acides gras ainsi que par la synthèse endogène provenant du foie à partir de l'ALA[98]. Toutefois, le taux de DHA cérébral semble plus difficile à moduler par la diète qu'au sein d'autres organes [90,93,99]. L'EPA, pour sa part, est plus sensible que le DHA aux fluctuations d'apports alimentaires en acides gras[100]. L'hypothèse derrière cette préservation des niveaux de DHA est qu'il s'agit d'un acide gras essentiel à la structure et aux fonctions cérébrales, c'est pourquoi des mécanismes encore inconnus seraient mis en œuvre afin d'y maintenir une concentration stable[99]. La composition lipidique de certains organes peut être associée à certaines psychopathologies. C'est le cas entre autres

de la dépression. Une relation inverse existe entre le risque de souffrir de dépression et les niveaux d'n-3 présents dans les globules rouges[101,102]. Ces derniers constituent un biomarqueur fréquemment utilisé dans les études cliniques pour déterminer l'apport alimentaire à court terme en n-3[103]. Pour ce qui est de la composition lipidique du cerveau reliée à la dépression, les études cliniques ont démontré, jusqu'à présent, des résultats négatifs[104–106]. Considérant les effets bénéfiques des n-3 sur ce type de pathologie, plus de recherches sont donc nécessaires pour mieux comprendre la mécanistique derrière cette observation.

## **1.4. GPR120**

### **1.4.1. Classification et structure**

Les *G-protein coupled receptor* (GPCR) sont des récepteurs transmembranaires qui participent à des mécanismes de signalisation intracellulaires impliqués dans une multitude de fonctions à travers l'organisme. D'ailleurs, ceux-ci font partie d'une famille importante de récepteurs comptant environ 850 différents GPCR dans le corps humain[107] et constituent la cible de près de 50% des médicaments sur le marché[108]. Par définition, ces récepteurs possèdent un domaine N-terminal extracellulaire, sept hélices alpha qui traversent la membrane[109], que l'on appelle également domaine transmembranaire, ainsi qu'un domaine C-terminal intracellulaire[110]. Les GPCR peuvent être activés par de multiples ligands qui incluent les acides gras à chaînes courtes, moyennes et longues, les neurotransmetteurs, les hormones de même que les ondes lumineuses[107]. Les GPCR sont généralement classifiés selon leur séquence d'acides aminés ainsi que par leurs similarités fonctionnelles. La classe A inclut les récepteurs de type rhodopsine. Elle est considérée comme la plus grande famille de GPCR, puisqu'elle regroupe les récepteurs aux hormones, aux neurotransmetteurs et à la lumière. Les autres classes se détaillent comme suit :

- La classe B ou famille de récepteurs de la sécrétine
- La classe C ou famille de récepteurs métabotropiques du glutamate

- La classe D ou famille de récepteurs de phéromones de reproduction fongique
- La classe E ou famille de récepteurs de l'adénosine monophosphate cyclique
- La classe F ou famille de récepteurs *frizzled/smoothed*[111].

GPR120 (*G-protein coupled receptor 120*) ou FFA4 (*Free-fatty acid receptor-4*) est un GPCR de type rhodopsine qui a été décrit pour la première fois en 2003[109] (Figure 6).

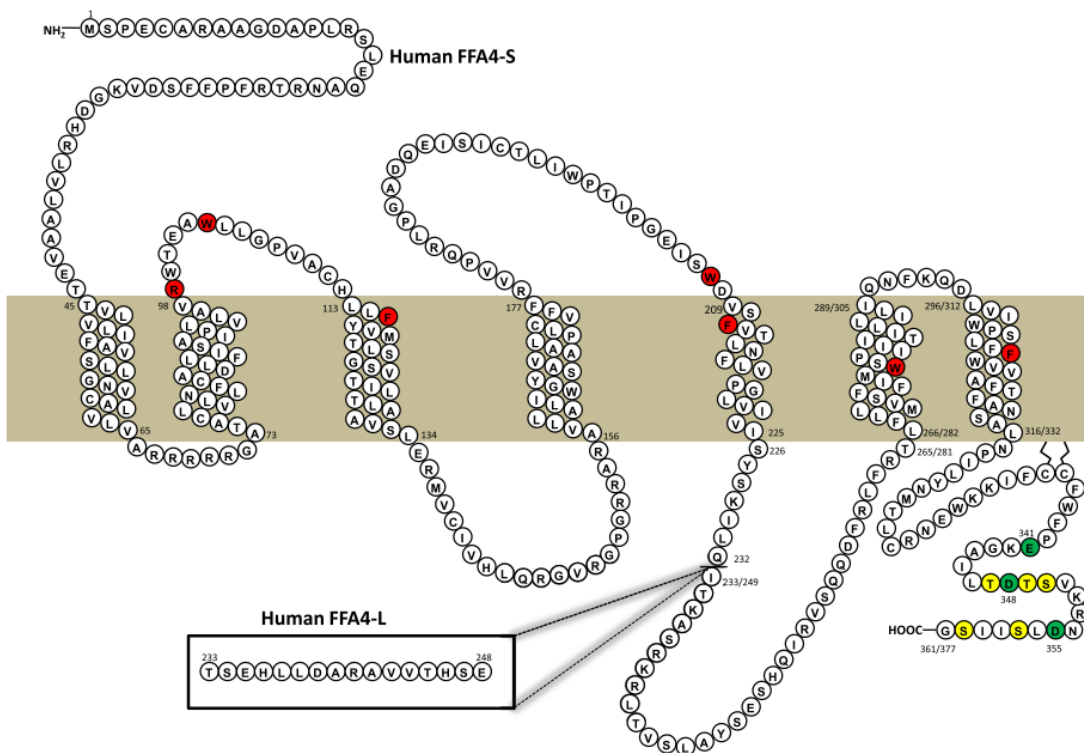


Figure 6. Diagramme de type snake-plot (d'après Moniri, 2016)[112].

Légende : A : Alanine, C: Cystéine, D: Acide aspartique, E: Acide glutamique, F: Phénylalanine, G: Glycine, H: Histidine, I: Isoleucine, K: Lysine, L: Leucine, M: Méthionine, N : Asparagine, P : Proline, Q : Glutamine, R: Arginine, S: Sérine, T: Thréonine, V: Valine, W: Tryptophane, Y: Tyrosine



Ce récepteur est entre autres exprimé dans les membranes cellulaires de l'intestin, des poumons de même qu'au sein d'adipocytes et de macrophages [113–115]. GPR120 est activé par une large gamme d'acides gras saturés et insaturés à chaînes longues[116], avec une affinité plus prononcée pour les acides gras n-3[117].

#### **1.4.2. Rôles métaboliques et anti-inflammatoires**

Les rôles attribués à GPR120 sont multiples, considérant son modèle d'expression dans divers organes à travers l'organisme[118]. Néanmoins, ceux-ci tournent majoritairement autour de deux grands thèmes : son implication dans les fonctions métaboliques et dans les fonctions anti-inflammatoires.

D'abord, Hirasawa et coll., en 2005, ont été l'une des premières équipes de recherche à identifier l'implication de ce récepteur dans l'homéostasie de l'insuline et du glucose. En effet, ils ont démontré qu'une stimulation de GPR120 chez la souris par des acides gras à longues chaînes induisait une augmentation de la sécrétion de GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) dans l'intestin. Cette équipe a montré que cette activation, autant *in vitro* qu'*in vivo*, induit une augmentation de l'insuline circulante[119]. Plus tard, en 2012, l'équipe du Dr Philippe Forguel a confirmé le rôle joué par GPR120 dans la balance énergétique. Ils ont démontré qu'un variant dysfonctionnel du gène de GPR120 augmente les risques de souffrir d'obésité, et ce, autant chez la souris que chez l'Homme[120]. Ensuite, en 2014, l'équipe de Dr Jerrold M. Olefsky rapporte qu'un agoniste spécifique de GPR120, le *compound A* (cpdA), diminue l'inflammation de manière dépendante à GPR120. En effet, ces chercheurs ont généré des souris *knock-out* (KO) de GPR120 spécifiquement dans les macrophages. Ils ont nourri ces souris avec une diète riche en gras enrichie de cpdA. Ils ont démontré que GPR120 est essentiel à la réduction de l'inflammation, puisque le cpdA perd ses effets bénéfiques chez la souris GPR120 KO. Ils ont aussi montré les effets protecteurs de l'agoniste sur la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose chez les souris obèses, effet qui est complètement perdu avec l'invalidation du gène de GPR120. Ils rapportent également les bénéfices de cet agoniste sur la potentialisation de l'insuline dans le foie en diminuant la stéatose hépatique chez les souris obèses[121]. Néanmoins, les résultats

démontrant les effets anti-inflammatoires et d'augmentation de la sensibilité à l'insuline de ce récepteur restent controversés. En effet, un article publié en 2016 par une équipe danoise argumente que ces effets bénéfiques sont indépendants de GPR120[122]. Ces contradictions démontrent que plus de recherches sont nécessaires pour élucider l'implication de ce récepteur au niveau métabolique et anti-inflammatoire.

Au niveau cérébral plus spécifiquement, les connaissances au sujet du rôle de GPR120 restent limitées. Une équipe brésilienne a démontré en 2012 qu'une injection intracérébroventriculaire (ICV) d'n-3 réduit l'inflammation cérébrale induite par une diète haute en gras. Ils ont également montré l'expression de GPR120 dans le noyau arqué de l'hypothalamus et plus précisément dans les neurones orexigènes AgRP/NPY[123]. Par la suite, une autre équipe a démontré qu'une injection ICV d'un agoniste non spécifique de GPR120 réduirait les comportements de type anxieux chez la souris[124]. Il n'en reste pas moins que l'implication de GPR120 dans la réduction de l'inflammation cérébrale et des comportements anxio-dépressifs sous-jacents reste méconnue et nécessite plus de recherche. Ce dernier point, combiné aux contradictions actuellement présentes au sujet du rôle métabolique et anti-inflammatoire de GPR120, ont grandement motivé l'initiation du projet présenté dans l'article 2 de ce mémoire.

#### **1.4.3. Mécanisme anti-inflammatoire**

En fonction du type cellulaire où GPR120 est exprimé, celui-ci utilisera un mécanisme de signalisation cellulaire différent. Lorsque ce récepteur est impliqué dans la fonction inflammatoire et exprimé à la membrane des cellules immunitaires comme les macrophages, GPR120 implique la signalisation de  $\beta$ -arrestin-2. Comme il est démontré à la figure 7, lorsqu'un ligand extracellulaire comme les n-3 se lie au récepteur, celui-ci sera phosphorylé par des kinases qui augmenteront l'affinité de son domaine intracellulaire qui séquestre la protéine  $\beta$ -arrestin-2. Cette liaison entraînera l'internalisation du complexe GPR120- $\beta$ -arrestin-2 vers le cytoplasme. Ce complexe interagira avec la protéine TAB1 (*Transforming growth factor- $\beta$  activated kinase 1-*

*binding protein*) qui empêchera sa liaison avec TAK1 (*Transforming growth factor- $\beta$  activated kinase 1*)[118]. La cascade pro-inflammatoire qui s'ensuit l'activation de TAK1 est possible entre autres via l'activation de deux récepteurs membranaires distincts. Premièrement, TNFRF (*tumor necrosis factor receptor*) peut être activé par TNF- $\alpha$  circulant. Deuxièmement, le lipopolysaccharide (LPS), la composante active des endotoxines produites par les bactéries Gram négatives[125], ou encore les acides gras saturés [126] peuvent activer le récepteur TLR4 (*Toll-like receptor 4*)[115]. La liaison de TAB1 et TAK1 engendre une cascade de signalisation pro-inflammatoire qui implique entre autres l'activation de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), IKK (*I $\kappa$ B kinase*) et NF $\kappa$ B. En bloquant l'interaction de TAB1 et TAK1, GPR120 court-circuite l'effet de l'activation des récepteurs TNFRF et TLR4, et empêche donc l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ [118].

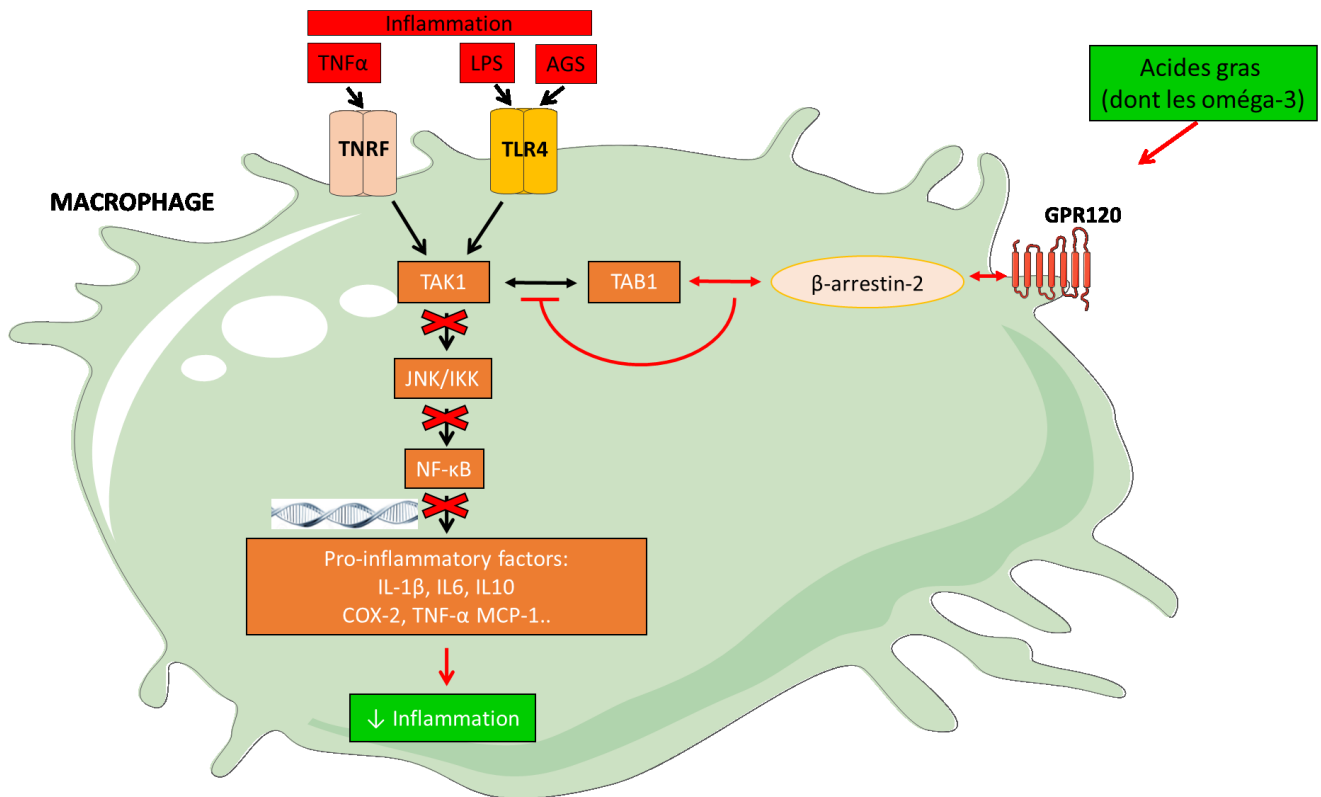


Figure 7. Schéma du mécanisme anti-inflammatoire de GPR120 dans un macrophage (adapté de Oh et coll., 2010[115] et Zhang, 2014[110]).

Les flèches rouges représentent l'effet anti-inflammatoire médié par les n-3 et les flèches noires représentent l'effet pro-inflammatoire médié par l'activation des récepteurs TNFR ou TLR4.

## **1.5. Hypothèses et objectifs de recherche**

### **1.5.1. Hypothèses**

Nous formulons l'hypothèse qu'une supplémentation chronique en n-3 en contexte pro-inflammatoire induit par l'obésité améliore les comportements anxio-dépressifs, la sensibilité au glucose, la composition lipidique cérébrale ainsi la neuroinflammation. Nous émettons également l'hypothèse que l'activation microgliale de GPR120 diminue la neuroinflammation *in vitro* de même que les comportements anxio-dépressifs associés *in vivo*.

### **1.5.2. Objectifs**

- Mesurer les impacts d'une supplémentation chronique en n-3 en contexte d'obésité induite par la diète sur les paramètres métaboliques, incluant entre autres la composition corporelle, la sensibilité au glucose et la dépense énergétique, les comportements anxio-dépressifs, la composition lipidique du cerveau et la neuroinflammation.
- Décrire les effets de l'activation microgliale *in vitro* de GPR120 en contexte pro-inflammatoire de même que ses répercussions comportementales et inflammatoires *in vivo*.

## **1.6. Contribution aux articles**

Les deux manuscrits présentés dans ce mémoire sont des versions préliminaires non publiées au moment du dépôt de ce mémoire. Pour l'article 1, j'ai effectué en majorité les mesures et analyses métaboliques, comportementales de même que les mesures d'expression génique. J'ai collaboré sur cet article avec la plateforme de phénotypage métabolique et physiologie biocellulaire du CRCHUM pour les mesures de sécrétion protéique et avec l'équipe de Christine DesRosiers à l'Institut de cardiologie de Montréal pour les analyses de composition lipidique cérébrale. Pour l'article 2, j'ai effectué toutes les mesures d'expression génique, de sécrétion protéique en plus des tests de comportement. J'ai finalement majoritairement contribué à la rédaction de ces deux manuscrits.

## Chapitre 2: Article 1 (non publié)

### **Omega-3 fatty acid supplementation defends against metabolic, angiogenic and neurolipid consequences of a saturated high-fat diet**

Geneviève Demers<sup>1,3</sup>, Arturo Israel Machuca Parra<sup>1,2</sup>, Diane Bairaman<sup>1,3</sup>, Zahra Dashtehei Pour<sup>1,3</sup>, Caroline Daneault<sup>5</sup>, Christine Des Rosiers<sup>3,5</sup>, Thierry Alquier<sup>1,4\*</sup> and Stephanie Fulton<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Montreal Diabetes Research Center and Centre de Recherche du CHUM.

Departments of: <sup>2</sup> Neuroscience, <sup>3</sup> Nutrition, <sup>4</sup> Medicine - Université de Montréal.

<sup>5</sup>Montreal Heart Institute. *\*Equal contribution*

#### **Corresponding author:**

Stephanie Fulton, PhD

Centre de Recherche du CHUM

900 rue Saint-Denis, 8-428

Montréal, QC H2X 0A9

Canada

**Acknowledgments**

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to SF and from Merck Sharp Dohme Corp to SF, TA and CD. GD was supported by a FRQS graduate fellowship, and SF and TA are supported by FRQS salary awards.

**Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

## **Abstract**

**Background:** Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3) improve obesity-associated insulin resistance and chronic inflammation and are effective in alleviating neuroimmune activation and depressive-like symptomology. Obesity significantly elevates the odds of developing depression whereas in mice chronic consumption of a diet rich in saturated fat elicits anxiety and despair in a manner linked to metabolic dysfunction and neuroinflammation.

**Hypothesis:** N-3 supplementation improves energy homeostasis, anxiodepressive behavior and neurolipid composition altered by diet-induced obesity.

**Objectives:** To measure the effects of a chronic n-3 supplementation in a context of obesity on metabolic, behavioral and inflammatory parameters as well as neurolipid composition.

**Methods:** Male C57Bl/6J mice were fed a saturated high-fat diet (HFD) or chow for 20 weeks. During the last 5 weeks mice received daily supplementation (gavage) of fish oil or corn oil. Food intake and body weight were measured throughout while additional metabolic parameters and anxiodepressive behaviors (elevated-plus maze, light-dark box and forced swim test) were evaluated during the final week of supplementation. Forebrain lipid composition and markers of reactive gliosis were assessed by gas chromatography mass spectrometry and real-time PCR, respectively. Data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey pairwise post-tests,  $p < 0.05$ .

**Results:** Five weeks of n-3 supplementation completely normalized glucose intolerance in HFD mice without affecting body weight or fat mass. N-3 supplementation also defended against anxiety- and despair-like behavioral responses to HFD. Brain lipids, particularly polyunsaturated fatty acids, were altered by HFD and largely reversed by n-3 supplementation whereas markers of microglial activity were diminished by n-3 supplementation.

**Conclusions:** Fish oil supplementation following obesity onset and during consumption of a saturated high-fat diet corrects glucose homeostasis, inhibits anxiodepressive behaviors, restores neurolipid composition and decreases indices of neuroinflammation. Together, these findings support the effectiveness of n-3



supplementation for the improvement of peripheral and central metabolic disturbances associated with poor dietary lifestyle and obesity.

**Keywords** Diet-induced obesity; Omega-3 fatty acids; Glucose tolerance; Anxiety; Brain lipidomic.

## Introduction

Obesity is a multifactorial health problem that confers a major economic burden. While often associated with heightened risk for cardiovascular and metabolic diseases<sup>1-4</sup>, obesity also significantly increases the incidence of mood disorders<sup>5-7</sup>. Anxiety and depressive disorders impair quality of life, motivation and occupational functioning, and these consequences diminish treatment adherence to further enhance metabolic dysfunction and associated complications<sup>8</sup>. As metabolic and mood deficits exacerbate the threat of obesity there is an imminent need to identify suitable therapeutic interventions.

Obesity is often characterized by a state of low-grade inflammation. Several lines of evidence suggest that enhanced immune activation, especially that concurrent with visceral obesity, contributes to metabolic and mood impairments, including insulin resistance and anxiodepressive behaviors, respectively. Excess consumption of saturated fats, in particular, is known to aggravate metabolic dysfunction in obesity, in part by generating physiological responses that favour deposition of pro-inflammatory visceral adipose tissue<sup>9-11</sup>. We recently reported that saturated (but not monounsaturated) high-fat feeding in mice that promotes visceral obesity, peripheral inflammation and glucose intolerance triggers anxiodepressive behavior via NFκB-mediated neuroinflammatory processes in the nucleus accumbens (NAc), a brain region linked to the hedonic and motivation deficits associated with depression. These findings along with clinical and epidemiological data linking poor diet quality (including excess saturated fat), metabolic dysfunction and depressive symptomology<sup>10-13</sup> and the protective effects of a Mediterranean diet<sup>14</sup> strongly suggest that the type and amount of dietary lipids contribute to the development of anxiodepressive disorders.

Consumption of omega-3 fatty acids (n-3), such as eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acids (DHA), has been shown to reduce cerebral inflammation coincident with obesity<sup>15</sup>. In addition, n-3 dietary deficiency and lower brain n-3 concentrations are reported to potentiate anxiety- and depressive-like behaviors in rodents<sup>16-18</sup>. Consistently, n-3 supplementation (principally EPA) can effectively lessen

depressive symptoms in people suffering from bipolar and major depressive disorders<sup>19</sup>. Despite these findings, the impact of n-3 supplementation in the context of obesity and ongoing consumption of a diet high in saturated fat on metabolic and emotional endpoints has not been fully explored.

The present study aimed to determine the effects of a chronic n-3 supplementation in mice following the onset of obesity and during a saturated high-fat diet on metabolic, behavioral, anti-inflammatory neuropilids and brain gliosis markers.

## Methods

### Animals

All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of the CRCHUM in accordance with the standards of the Canadian Council on Animal Care. Seven to eight-week-old male C57BL/6J mice were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA). Upon arrival, mice were individually housed and maintained in an environmentally controlled room (22–24°C) with ad libitum access to standard chow and water. Mice were acclimatized to a reverse light/dark cycle for at least seven days prior to initiation of experiments. Mice were decapitated under isoflurane anesthesia. Brains and blood samples were harvested and stored at -80°C.

### Diets and Fish Oil Supplementation

Mice (n=12/group) received *ad libitum* access to either a saturated high-fat diet (HFD) containing 50% kcal palm oil or an ingredient-matched, control chow diet containing 16.8% kcal soybean oil for 20 weeks (Supplemental Fig. 1A). During the last 5 weeks (from the 16<sup>th</sup> to the 20<sup>th</sup> week) of the diet protocol, mice from the HFD and chow groups received daily gavage of fish oil (FO; Omega Protein; Houston, TX, USA) or control corn oil (Ctrl; Sigma–Aldrich; St. Louis, MO, USA) (Table 1) defining four experimental groups: high-fat diet + control (HFD<sup>Ctrl</sup>); high-fat diet + fish oil (HFD<sup>FO</sup>); chow diet + control (chow<sup>Ctrl</sup>); chow diet + fish oil (chow<sup>FO</sup>). Fish oil supplementation (0.7 mg/kg body weight) was based on the American Dietetic Association and Dietitians of Canada recommendations for humans of 500 mg of combined DHA and EPA per day<sup>20</sup> and subsequently dose-converted for mice according to published standards<sup>21</sup>. Diets and supplementation continued throughout metabolic and behavioral testing.

## Metabolic Profiling

Body weight and food intake were measured weekly whereas additional metabolic measurements were performed during the 19<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> week of diet. For glucose tolerance tests (GTT), mice were fasted for four hours prior to intraperitoneal (IP) injection of glucose (2 g/kg of body weight). Blood glucose was measured at 0, 15, 30, 60 and 120 minutes post-injection. Lean and fat mass were measured using nuclear Echo MRI (Echo Medical Systems; Houston, Texas). Energy expenditure (normalized to lean mass), respiratory exchange ratio (RER:  $VCO_2/VO_2$ ) and ambulatory activity were assessed for 24 hours after a 24-hour habituation period in the Comprehensive Lab Animal Monitoring System (CLAMS; Columbus Instruments) set at 22°C.

## Behavioral Experiments

All behavioral tests were video recorded and analyzed using Ethovision XT software system (Noldus). Behavioral testing was carried out during the 19<sup>th</sup> week of diet. All testing was performed in the light just before dark cycle onset.

## Elevated-Plus Maze

The elevated-plus maze (EPM) was used to assess anxiety-like behavior as previously reported<sup>22</sup>. In brief, each mouse was placed in the center of the maze facing an open arm opposing the experimenter. Number of open arm entries, percentage of open arm time and distance travelled were measured over a period of five minutes.

## Light/Dark Box

The light/dark box (LDB) was used as an additional measure of anxiety-like behavior. The mouse LDB apparatus (Med Associates, Inc.) consists of an illuminated compartment next to a dark compartment covered by a lid (both 13.7 cm X 13.7 cm X 20.3 cm). The two boxes were separated by a partition wall with an opening at the

bottom to allow the animal to pass freely between compartments. The number of entries and time spent in the lit compartment were measured for five minutes.

### Forced Swim Test

The forced swim test was used as a measure of behavioral despair as described in detail previously<sup>22</sup>. Mice are placed in a beaker of water (24°C) for 6 minutes. Velocity and locomotor capacity are evaluated during the first two minutes while mobility is measured during the last four minutes.

### Brain Lipid Quantification

Forebrains (n=12 per group) were used for quantitative profiling of fatty acids, both free and bound to triglycerides and phospholipids, by gas chromatography-mass spectrometry using previously described methods<sup>23–25</sup>. In brief, samples containing 25 mg of pulverized forebrain tissue were incubated overnight at 4°C in a solution of chloroform/methanol (2:1) containing 0.004% butylated hydroxytoluene (BHT), filtered through gauze and dried under nitrogen gas. Fatty acids were analyzed as their methyl esters after a direct transesterification with acetyl chloride/methanol on a 7890B gas chromatograph coupled to a 5977A Mass Selective Detector (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) equipped with a capillary column (J&W Select FAME CP7420; 100 m x 250 µm inner diameter; Agilent Technologies Inc.) and operated in the PCI mode using ammonia as the reagent gas. Samples (0.4 µL) were analyzed under the following conditions: injection at 270°C in a split mode (split ratio: 50:1) using high-purity helium as the carrier gas (constant flow rate: 0.44 mL/min) and the following temperature gradient: 190°C for 25 min, increased by 1.5°C/min until 236°C. Fatty acids were analyzed as their [M+NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> ion by selective ion monitoring and concentrations were calculated using standard curves and isotope-labeled internal standards.

## Quantitative PCR

Samples of forebrain tissue were processed for mRNA extraction (TRIzol method; Invitrogen) and cDNA synthesis. Quantitative gene expression was measured from 1:10 cDNA dilutions. RT-PCR were performed using the QuantiFast SYBR Green PCR kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's guidelines on a Corbett Rotor-Gene 6000.

Iba-1            forward: GGATTTGCAGGGAGGAAAAG,  
                  reverse: TGGGATCATCGAGGAATTG;  
GFAP            forward: AACGACTATCGCCGCCAACTG,  
                  reverse: CTCTTCCTGTTGCGGCATTTG;  
Cyclophilin    forward: GCTTTTCGCCGCTTGCTGCA,  
                  reverse: TGCAAACAGCTCGAAGGAGACGC.

Relative gene expression was calculated using the  $\Delta\Delta$ CT method using cyclophilin as the housekeeping gene. Each PCR reaction was performed in triplicate.

## Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

For plasma protein measurements, blood was collected after decapitation, kept on ice and then centrifuged at 8000 g for 10 min at 4°C. Plasma was stored at -80°C until further use. Insulin was measured using the antibodies and reference standards contained in R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) Duokits enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to the manufacturer's protocol.

## Statistical Analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 6 software (San Diego, CA, USA). Outliers were removed using Grubbs' test set at  $p \leq 0.05$ . A two-way ANOVA with Tukey pairwise post-tests were used to evaluate group comparisons as described in the figure legends. All data are presented as mean  $\pm$  SEM.  $p < 0.05$  was set as criterion for statistical significance.

## Results

### N-3 supplementation attenuates metabolic disturbances induced by a saturated high-fat diet

We first sought to determine the impact of n-3 supplementation on metabolic endpoints in mice fed a HFD or control chow diet. As shown in Figure 1A, body weights of HFD mice significantly increased as compared to control mice (Overall diet effect;  $F_{(3,38)} = 24.74$ ;  $p < 0.0001$ ); however, n-3 supplementation failed to significantly affect body weights in either diet group. n-3 did not either change fat or lean mass body composition (Fig. 1B). Calorie intake was elevated in HFD<sup>Ctrl</sup> mice (Overall diet effect;  $F_{(3,38)} = 78.44$ ;  $p < 0.0001$ ) and n-3 supplementation resulted in a small, but significant decrease in food intake in HFD<sup>FO</sup> mice by the 5<sup>th</sup> week without affecting food intake in control mice (Overall diet and supplementation effect;  $F_{(3,38)} = 88.42$ ;  $p < 0.0001$ ; Fig. 1C). HFD and FO supplementation failed to affect locomotor activity in the dark and light cycle (Fig. 1D-E). As expected, HFD decreased RER towards higher lipid utilization (Fig. 1F-G) and increased total energy expenditure (Fig. 1H); however, n-3 supplementation did not influence RER or energy expenditure in either diet group (Fig. 1F-H). HFD promoted glucose intolerance which was corrected by n-3 supplementation: glucose excursion curves for HFD<sup>FO</sup> mice were similar to Chow<sup>Ctrl</sup> mice (Overall diet and supplementation effect;  $F_{(3,36)} = 9.601$ ;  $p < 0.0001$ ; Fig. 1I). HFD resulted in hyperinsulemia (Overall diet effect;  $F_{(1,32)} = 15.14$ ;  $p = 0.0005$ ; Fig. 1J). and n-3 supplementation failed to alter plasma insulin levels in either group.

### Omega-3 supplementation protects against anxiety-and depressive-like behavior triggered by a saturated high-fat diet

We set out to determine the influence of diet-induced obesity with or without n-3 supplementation on anxiety and depressive-like behaviour using three behavioral tasks. In the elevated-plus maze (EPM), chronic high-fat feeding increased signs of anxiety as suggested by reduced open arm entries (Overall diet effect;  $F_{(1,35)} = 7.946$ ;  $p = 0.0079$ ; Fig. 2A) and proportion of time spent in the open arms for HFD<sup>Ctrl</sup> mice as



compared to Chow<sup>Ctrl</sup> mice (Overall diet effect;  $F_{(1,35)} = 7.315$ ;  $p=0.0105$ ; Fig. 2A). N-3 supplementation removed this difference between groups: open arm entries (Overall supplementation effect;  $F_{(1,35)} = 2.215$ ;  $p=0.1456$ ; Fig. 2A) and time (Overall supplementation effect;  $F_{(1,35)} = 0.4955$ ;  $p=0.4861$ ; Fig. 2A) between Chow<sup>Ctrl</sup> and HFD<sup>FO</sup> groups were not significantly different. HFD also decreased distance travelled in the EPM (Overall diet effect;  $F_{(1,34)} = 5.203$ ;  $p=0.0289$ ; Fig. 2A), an effect reversed by n-3 supplementation (Overall supplementation effect;  $F_{(1,34)} = 3.684$ ;  $p=0.0634$ ; Fig. 2A). In a second test of anxiety, the light/dark box (LDB), high-fat feeding again triggered anxiety-like behavior as demonstrated by a lower number of entries (Overall diet effect;  $F_{(1,35)} = 2.001$ ;  $p=0.1660$ ; Fig. 2B) and proportion of time spent in the lit compartment in HFD<sup>Ctrl</sup> mice relative to Chow<sup>Ctrl</sup> mice (Overall diet effect;  $F_{(1,36)} = 10.98$ ;  $p=0.0021$ ; Fig. 2B). In contrast, the HFD<sup>FO</sup> group had similar entries (Overall supplementation effect;  $F_{(1,35)} = 4.268$ ;  $p=0.0463$ ; Fig. 2B) and lit compartment time as compared to the Chow<sup>Ctrl</sup> group (Overall supplementation effect;  $F_{(1,36)} = 0.05502$ ;  $p=0.8159$ ; Fig. 2B). In the forced swim test (FST), HFD enhanced behavioral despair: Immobility time was increased in HFD<sup>Ctrl</sup> mice as compared to Chow<sup>Ctrl</sup> mice (Overall diet effect;  $F_{(1,36)} = 9.987$ ;  $p=0.0032$ ; Fig. 2C). On the other hand, immobility time was similar between HFD<sup>FO</sup> and Chow<sup>Ctrl</sup> mice (Overall supplementation effect;  $F_{(1,36)} = 0.7648$ ;  $p=0.3876$ ; Fig. 2C). As an index of locomotor capacity, swim velocity was comparable across the four groups (Overall diet effect;  $F_{(1,36)} = 1.326$ ;  $p=0.2572$ ; Overall supplementation effect;  $F_{(1,36)} = 0.6359$ ;  $p=0.4304$ ; Fig. 2C).

### Saturated high fat feeding and omega-3 supplementation modulate brain fatty acid content

To evaluate the impact of an n-3 supplementation on brain lipid composition, we performed quantitative profiling of forebrain fatty acid content. As shown in Figure 3, several polyunsaturated fatty acids were modified by the HFD including eicosapentaenoic acid (EPA; Overall diet effect;  $F_{(1,29)} = 7.714$ ;  $p=0.0095$ ), dihomo- $\gamma$ -linolenic acid (DGLA; Overall diet effect;  $F_{(1,37)} = 49.74$ ;  $p<0.0001$ ) and linoleic acid (LA; Overall diet effect;  $F_{(1,27)} = 15.07$ ;  $p=0.0006$ ). An important supplementation effect was

also observed in the high-fat fed animals for EPA (Overall supplementation effect;  $F_{(1,29)} = 48.32$ ;  $p < 0.0001$ ), DPA (Overall supplementation effect;  $F_{(1,29)} = 50.51$ ;  $p < 0.0001$ ), DGLA (Overall supplementation effect;  $F_{(1,37)} = 12.3$ ;  $p = 0.0012$ ) and arachidonic acid (AA; Overall supplementation effect;  $F_{(1,36)} = 15.14$ ;  $p = 0.0004$ ). Results for other fatty acids are shown in Table 2.

Fish oil supplementation rescues brain reactive gliosis generated by a chronic high fat diet.

As a final step, we measured glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1) mRNA as markers of forebrain reactive gliosis. As shown in Figure 4, while HFD did not significantly alter expression levels for GFAP (Overall diet effect;  $F_{(1,37)} = 0.03956$ ;  $p = 0.8434$ ) and Iba-1 (Overall diet effect;  $F_{(1,38)} = 0.06012$ ;  $p = 0.8076$ ), n-3 supplementation resulted in a near significant trend for reduced GFAP levels (Overall supplementation effect;  $F_{(1,37)} = 10.44$ ;  $p = 0.0026$ ) and decreased Iba-1 levels in the HFD<sup>FO</sup> mice relative HFD<sup>Ctrl</sup> mice (Overall supplementation effect;  $F_{(1,38)} = 1.512$ ;  $p = 0.2264$ ).

## Discussion

An increase in n-6 intake to the detriment of n-3 has been observed over recent decades, a change in dietary pattern that is posited to contribute to heightened immune activity and enhancement of obesity-associated conditions<sup>26</sup>. Accordingly, the inverse relationship between both body mass index<sup>27</sup> and depression rates<sup>28</sup> with circulating n-3 fatty acid levels implicates n-3 intake in the regulation of energy balance and mood.

While several reports assessed the protective effects of n-3 against the development of obesity, using diets varying in nutritional composition<sup>29–31</sup>, very little research evaluated n-3 consumption consequences when obesity is already present<sup>32</sup>. Moreover, to our knowledge, no study has administered n-3 via gavage, a method mimicking human n-3 supplementation. The present study investigated the impact of fish oil composition and concentrations based on recommendations for daily DHA and EPA intake established by the WHO. DHA and EPA are more biologically potent than alpha-linolenic acid, an n-3 fatty acid widely used in studies<sup>33</sup> and criticized for its limited ability to convert to longer chain fatty acids<sup>34</sup>.

On the other hand, we cannot ignore the potential confounding effect of the concentration of EPA and DHA in the FO formula. It is important to keep in mind that the observed beneficial effects of this FO could be attributed to other fatty acids or their synergy between them. Nevertheless, we hypothesize that a large part of the benefits can be attributed to EPA and DHA, considering the vast literature on their beneficial effects.

Alterations in body weight following nutritional interventions can confound explanation of glycemic changes<sup>35</sup>. Previous studies demonstrated beneficial effects of n-3 on glucose tolerance in mice<sup>33,36,37</sup>; however, deviations in body weight and fat mass biased interpretation of results. Here we demonstrate that daily fish oil supplementation following obesity onset defends against the deleterious effects of a saturated high-fat diet on glucose tolerance and anxiety-like behavior despite absence of changes in body weight, fat mass and energy expenditure. While food intake was moderately reduced

and there was a trend for lower body weight for the HFD<sup>FO</sup> group by the fifth week of gavage, body composition was unchanged. Thus, the benefits of FO on glycemia are unlikely to be purely secondary to catabolic actions of n-3. Improved glucose tolerance did not coincide with changes in insulin levels however, in spite of predicted hyperinsulinemia in mice subjected to HFD. These findings suggest that n-3 supplementation may improve insulin sensitivity independent of modulating insulin synthesis and secretion.

Several mechanisms have been proposed to explain the greater onset of anxiety and depression in obesity, including immune activation, impaired hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and neuroendocrine dysfunction<sup>9</sup>. We recently reported that saturated, but not monounsaturated, high fat feeding triggers anxiodepressive behaviors<sup>38</sup>. Consistently, here we show increased anxiety-like behavior in the EPM and LDB tasks and indices of despair using the FST in HFD<sup>Ctrl</sup> mice. Although HFD<sup>Ctrl</sup> mice exhibited reduced distance traveled in the EPM we believe this reflects decreased exploratory behavior (increased anxiety) by HFD rather than blunted locomotor capacity: First, there were no changes in both dark and light cycle locomotion as measured in metabolic cages; second, there were no differences in swimming velocity in the FST; and third, the reduced distance travelled in HFD<sup>Ctrl</sup> mice in the EPM was reversed n-3 supplementation. Furthermore, the protective effect of n-3 supplementation on HFD-induced anxiodepressive behavior is supported by observations in the LDB and FST tasks.

Despite the abundance of DHA in the brain, several lines of evidence reveal the stability of brain DHA in response to dietary interventions<sup>39-41</sup>, findings consistent with our lipidomic results. EPA levels, on the other hand, fluctuate more rapidly and according to ongoing nutritional status. While decreases in brain DHA, EPA and DPA concentrations by HFD were not significant, our results demonstrate that FO supplementation substantially increased EPA and DPA levels in the brain, especially in high-fat fed mice. The lack of DHA changes may be due to the 5-week supplementation period implemented, as longer n-3 nutritional interventions have been shown to elevate brain DHA<sup>42</sup>. Interestingly, EPA rather than DHA supplementation ameliorates

depressive symptomology in randomized controlled trials of n-3 supplementation for individuals with major depressive disorder<sup>19</sup>. This is corroborated by rodent experiments showing the benefits of dietary EPA to rescue the deleterious effect of an intracerebroventricular interleukin-1 $\beta$  injection, a cytokine well implicated in inflammatory responses<sup>43</sup> and depressive behavior<sup>44</sup>. Two n-6 fatty acids, AA and DGLA, were also considerably modified by supplementation, in an opposing manner. DGLA was reduced by HFD and potentiated by n-3 supplementation in both chow and HFD groups. Although found in only trace amounts in the brain, DGLA yields anti-inflammatory eicosanoids and competes with AA for cyclooxygenase and lipoxygenase, inhibiting the production of AA's eicosanoids. Thus, decreases in brain DGLA by HFD and reversal by n-3 supplementation may participate towards corresponding decreased neuroimmune activity. Unlike Morselli et al., we did not find brain palmitate content increased following a high-fat diet exposure<sup>45</sup>. This discrepancy may be due to the different duration and nutritional composition of the diets used.

The pro-inflammatory state triggered by a high-fat diet is coincident with reactive gliosis in the brain<sup>38,41</sup>. Increased Iba-1 and GFAP markers reflect reactive gliosis, a neuroimmune response to invasion or injury. Although forebrain expression of Iba-1 and GFAP were not elevated by chronic high fat diet, these two markers were suppressed by n-3 supplementation in high-fat fed mice. The lack of HFD-induced reactive gliosis in our study is likely due to the use of whole forebrain samples and not specific brain regions (such as the NAc) that may be more sensitive to obesity-induced neuroinflammation.

How does n-3 supplementation offset metabolic dysfunction and anxiodepressive caused by diet-induced obesity? In view of increased brain n-3 levels following supplementation, we speculate that enhanced n-3 signaling may be partly involved. N-3 free fatty acids can activate GPR120<sup>46</sup>, a G protein-coupled receptor that is implicated in the anti-inflammatory effects of n-3 in the periphery, including the insulin-sensitizing effect of n-3 intake<sup>47</sup>. Such a possibility is consistent with our previous report showing the anxiolytic effects of central pharmacological GPR120 activation<sup>48</sup>. In parallel or alternatively, n-3 are known to be agonists and activators of nuclear peroxisome

proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ). This receptor is expressed in adipocytes where its activation promotes the expression of genes involved in glucose metabolism, thus improving glucose tolerance<sup>49,50</sup>. Also, the cellular mechanism used by enzymatic and non-enzymatic derivatives of n-3 fatty acids, which have been the subject of recent publications demonstrating their cardio and neuroprotective effects, remains largely unknown. Future research will be required to determine if either of these mechanisms or their combined actions could be involved in the protective effects of n-3 supplementation against diet-induced metabolic dysfunction.

## References

1. Rimm E, Stampfer M. Body size and fat distribution as predictors of coronary heart disease among middle-aged and older US men. *Am J Epidemiol.* 1995;144(12):1143-1150. <http://aje.oxfordjournals.org/content/141/12/1117.short>.
2. Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, et al. Prevalence of Diabetes, Impaired Fasting Glucose, and Impaired Glucose Tolerance in U.S. Adults. *Diabetes Care.* 1998;21(4):518-524. doi:10.4158/EP.12.4.358
3. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2595-2600. doi:10.1210/jc.2004-0372
4. Dixon JB. The effect of obesity on health outcomes. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;316(2):104-108. doi:10.1016/j.mce.2009.07.008
5. Garipey G, Nitka D, Schmitz N. The association between obesity and anxiety disorders in the population: A systematic review and meta-analysis. *Int J Obes.* 2010;34(3):407-419. doi:10.1038/ijo.2009.252
6. Faith MS, Butryn M, Wadden TA, Fabricatore A, Nguyen AM, Heymsfield SB. Evidence for prospective associations among depression and obesity in population-based studies. *Obes Rev.* 2011;12(501):438-453. doi:10.1111/j.1467-789X.2010.00843.x
7. Mannan M, Mamun A, Doi S, Clavarino A. Prospective Associations between Depression and Obesity for Adolescent Males and Females- A Systematic Review and Meta-Analysis of Longitudinal Studies. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157240. doi:10.1371/journal.pone.0157240
8. Luppino FS, De Wit LM, Bouvy PF, et al. Overweight, Obesity, and Depression A Systematic Review and Meta-analysis of Longitudinal Studies.
9. Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity.* 2008;16(6):1248-1255. doi:10.1038/oby.2008.210
10. Lai JS, Oldmeadow C, Hure AJ, et al. Inflammation mediates the association between fatty acid intake and depression in older men and women. *Nutr Res.* 2016;36(3):234-245. doi:10.1016/j.nutres.2015.11.017
11. Rogero MM, Calder PC. Obesity, inflammation, toll-like receptor 4 and fatty acids. *Nutrients.* 2018;10(4):1-19. doi:10.3390/nu10040432
12. Beydoun MA, Fanelli Kuczumarski MT, Beydoun HA, Rostant OS, Evans MK, Zonderman AB. Associations of the ratios of n-3 to n-6 dietary fatty acids with longitudinal changes in depressive symptoms among us women. *Am J*

*Epidemiol.* 2015;181(9):691-705. doi:10.1093/aje/kwu334

13. Q3 Q, Tolkien K, Bradburn S, Murgatroyd C. Meta-analyses An anti-inflammatory diet as a potential intervention for depressive disorders: A systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr.* 2018;(November):1-8. doi:10.1016/j.clnu.2018.11.007
14. Lassale C, Batty GD, Baghdadli A, et al. Healthy dietary indices and risk of depressive outcomes: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Mol Psychiatry.* 2018;(September). doi:10.1038/s41380-018-0237-8
15. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One.* 2012;7(1). doi:10.1371/journal.pone.0030571
16. Auguste S, Sharma S, Fiset A, et al. Perinatal deficiency in dietary omega-3 fatty acids potentiates sucrose reward and diet-induced obesity in mice. *Int J Dev Neurosci.* 2018;64(February 2017):8-13. doi:10.1016/j.ijdevneu.2017.09.003
17. Carrié I, Clément M, De Javel D, Francès H, Bourre J-M. Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *J Lipid Res.* 2000;41. <http://www.jlr.org.proxy3.library.mcgill.ca/content/41/3/473.full.pdf>. Accessed November 27, 2017.
18. Fernandes MF, Mutch DM, Leri F. The relationship between fatty acids and different depression-related brain regions, and their potential role as biomarkers of response to antidepressants. *Nutrients.* 2017;9(3). doi:10.3390/nu9030298
19. Grosso G, Pajak A, Marventano S, et al. Role of omega-3 fatty acids in the treatment of depressive disorders: A comprehensive meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS One.* 2014;9(5). doi:10.1371/journal.pone.0096905
20. Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada: Dietary Fatty Acids. *J Am Diet Assoc.* 2007;107(9):1599.e1-1599.e15. doi:10.1016/j.jada.2007.07.024
21. Nair A, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm.* 2016;7(2):27. doi:10.4103/0976-0105.177703
22. Sharma S, Fulton S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *Int J Obes.* 2013. doi:10.1038/ijo.2012.48
23. Gelinias R, Thompson-Legault J, Bouchard B, et al. Prolonged QT interval and lipid alterations beyond  $\beta$ -oxidation in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase null mouse hearts. *AJP Hear Circ Physiol.* 2011;301(3):H813-H823. doi:10.1152/ajpheart.01275.2010
24. Turcot V, Brunet J, Daneault C, Tardif JC, Des Rosiers C, Lettre G. Validation of fatty acid intakes estimated by a food frequency questionnaire using erythrocyte



- fatty acid profiling in the Montreal Heart Institute Biobank. *J Hum Nutr Diet*. 2015;28(6):646-658. doi:10.1111/jhn.12272
25. Thompson Legault J, Strittmatter L, Tardif J, et al. A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome. *Cell Rep*. 2015;13(5):981-989. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.054
  26. Simopoulos AP. An increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*. 2016;8(3):1-17. doi:10.3390/nu8030128
  27. Howe P, Buckley J. Metabolic Health Benefits of Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Mil Med*. 2014;179(11S):138-143. doi:10.7205/MILMED-D-14-00154
  28. Thesing CS, Bot M, Milaneschi Y, Giltay EJ, Penninx BWJH. Omega-3 and omega-6 fatty acid levels in depressive and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology*. 2018;87(May 2017):53-62. doi:10.1016/j.psyneuen.2017.10.005
  29. Parrish CC, Pathy DA, Angel A. Dietary Fish Oils Limit Adipose Tissue Hypertrophy in Rats. *Metabolism*. 1990;39(3):217-219.
  30. Hainault I, Carlotti M, Hajduch E, Guichard C, Lavau M. Fish Oil in a High Lard Diet Prevents Obesity, Hyperlipemia, and Adipocyte Insulin Resistance in Rats. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;683(1):98-101. doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb35696.x
  31. Belzung F, Raclot T, Groscolas R. Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 1993;264(6):R1111--R1118. <http://ajpregu.physiology.org/content/264/6/R1111>.
  32. Huang XF, Xin X, McLennan P, Storlien L. Role of fat amount and type in ameliorating diet-induced obesity: Insights at the level of hypothalamic arcuate nucleus leptin receptor, neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA expression. *Diabetes, Obes Metab*. 2004;6(1):35-44. doi:10.1111/j.1463-1326.2004.00312.x
  33. Oliveira V, Marinho R, Vitorino D, et al. Diets containing  $\alpha$ -linolenic ( $\omega$ 3) or oleic ( $\omega$ 9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. *Endocrinology*. 2015;156(11):4033-4046. doi:10.1210/en.2014-1880
  34. Burdge GC, Calder PC. Dietary  $\alpha$ -linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective. *Nutr Res Rev*. 2006;19(01):26. doi:10.1079/NRR2005113
  35. Tschöp MH, Speakman JR, Arch JRS, et al. A guide to analysis of mouse energy metabolism. *Nat Methods*. 2011;9(1):57-63. doi:10.1038/nmeth.1806
  36. Kalupahana N, Claycombe K. Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. *J ...*. 2010:1915-1922. doi:10.3945/jn.110.125732.1915

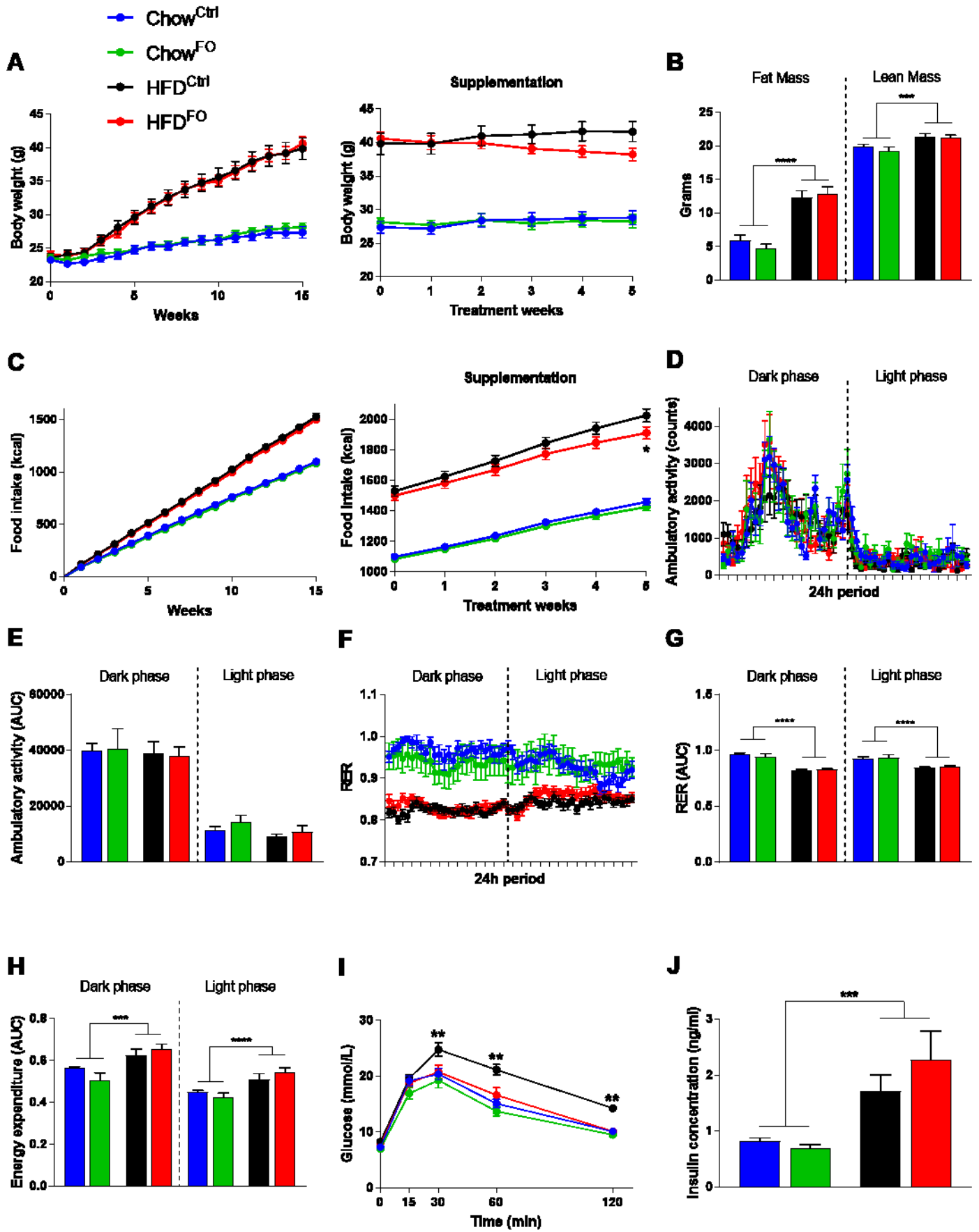
37. Kasbi Chadli F, Andre A, Prieur X, et al. n-3 PUFA prevent metabolic disturbances associated with obesity and improve endothelial function in golden Syrian hamsters fed with a high-fat diet. *Br J Nutr.* 2012;107(9):1305-1315. doi:10.1017/S0007114511004387
38. Décarie-Spain L, Sharma S, Hryhorczuk C, et al. Nucleus accumbens inflammation mediates anxiodepressive behavior and compulsive sucrose seeking elicited by saturated dietary fat. *Mol Metab.* 2018;10:1-13. doi:10.1016/j.molmet.2018.01.018
39. Bourre J, Dăcəomt O, Pascal G, et al. Nutrient Requirements and Interactions Dietary a-Linolenic Acid at 1 . 3 g / kg Maintains Maximal Docosahexaenoic Acid Concentration in Brain , Heart and Liver of Adult Rats1. 1993;(July 1992):1313-1319.
40. Mohrhauer H. and Holman R.T. Alteration of the fatty acid composition of brain lipids by varying levels of dietary essential fatty acids. *J Neurochem.* 1963;10:523-530. [http://chemport.cas.org/cgi-bin/sdcgi?APP=cp\\_scifinder&SERVICE=STN&CLI=scifinder&SID=388839-1088463628-103&FID=REDISPLAY&LANG=english&R=328246&DLP-REFERER=&DLP=1](http://chemport.cas.org/cgi-bin/sdcgi?APP=cp_scifinder&SERVICE=STN&CLI=scifinder&SID=388839-1088463628-103&FID=REDISPLAY&LANG=english&R=328246&DLP-REFERER=&DLP=1).
41. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* 2012. doi:10.1172/JCI59660
42. Naliwaiko K, Araújo RLF, Da Fonseca R V., et al. Effects of fish oil on the central nervous system: A new potential antidepressant? *Nutr Neurosci.* 2004;7(2):91-99. doi:10.1080/10284150410001704525
43. Song C, Manku MS, Horrobin DF. Long-chain polyunsaturated fatty acids modulate interleukin-1beta-induced changes in behavior, monoaminergic neurotransmitters, and brain inflammation in rats. *J Nutr.* 2008;138(5):954-963. doi:138/5/954 [pii]
44. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(1):46-56. doi:10.1038/nrn2297
45. Morselli E, Fuente-Martin E, Finan B, et al. Hypothalamic PGC-1 $\alpha$  Protects Against High-Fat Diet Exposure by Regulating ER $\alpha$ . *CellReports.* 2014;9:633-645. doi:10.1016/j.celrep.2014.09.025
46. Talukdar S, Olefsky JM, Osborn O. Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(9):543-550. doi:10.1016/j.tips.2011.04.004
47. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, et al. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell.* 2010. doi:10.1016/j.cell.2010.07.041

48. Auguste S, Fisette A, Fernandes MF, et al. Central Agonism of GPR120 Acutely Inhibits Food Intake and Food Reward and Chronically Suppresses Anxiety-Like Behavior in Mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2016;19(7):1-10. doi:10.1093/ijnp/pyw014
49. Martinez-Fernandez L, Laiglesia LM, Huerta AE, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015;121:1-18. doi:10.1016/j.prostaglandins.2015.07.003
50. Belchior T, Paschoal VA, Magdalon J, et al. Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation through PPAR $\gamma$ -dependent and PPAR $\gamma$ -independent actions. *Mol Nutr Food Res.* 2015;59(5):957-967. doi:10.1002/mnfr.201400914

**Table 1**

Composition (%)		Corn oil	Fish oil
Myristic	C14:0	<0,1	8,20
Palmitic	C16:0	8,6 - 16,5	18,43
Stearic	C18:0	1.0 - 3.3	3,36
Arachidonic	C20:0	< 0.8	0,20
Palmitoleic	C16:1	<0,5	11,51
Oleic	C18:1	20.0 - 42.2	9,16
Linolenic	C18:2	39.4 - 62.0	1,67
$\gamma$ -Linolenic	C18:3	0.5 - 1.5	0,28
Gondoic	C20:1	<0,5	0,19
Eicosapentaenoic (EPA)	C20:5		13,93
Heneicosapentaenoic (HPA)	C21:5		0,52
Docosapentaenoic (n-6 DPA)	C22:5		0,23
Docosapentaenoic (n-3 DPA)	C22:5		2,30
Docosahexaenoic	C22:6		13,35
Other		<0,9	16,67
TOTAL		100.0	100.0

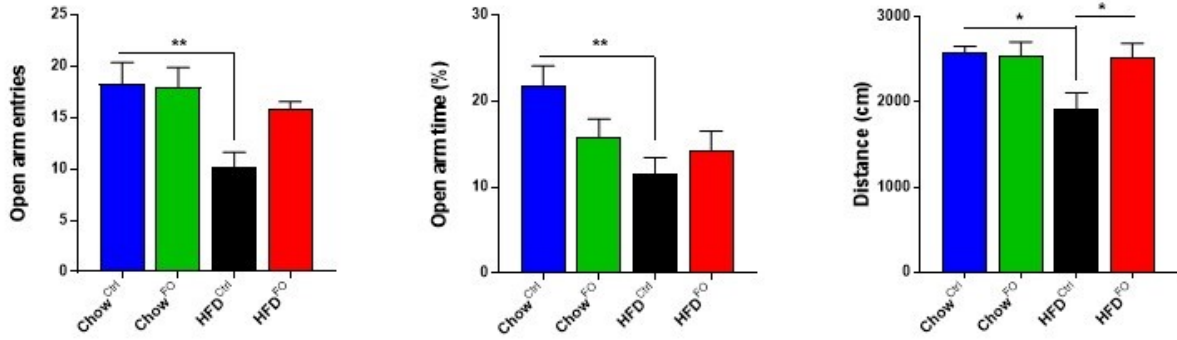
# Figure 1



**Figure 2**

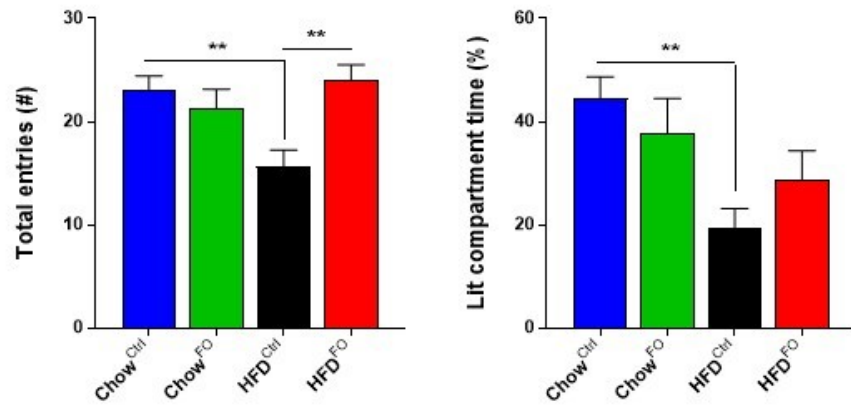
**A**

**Elevated-Plus Maze**



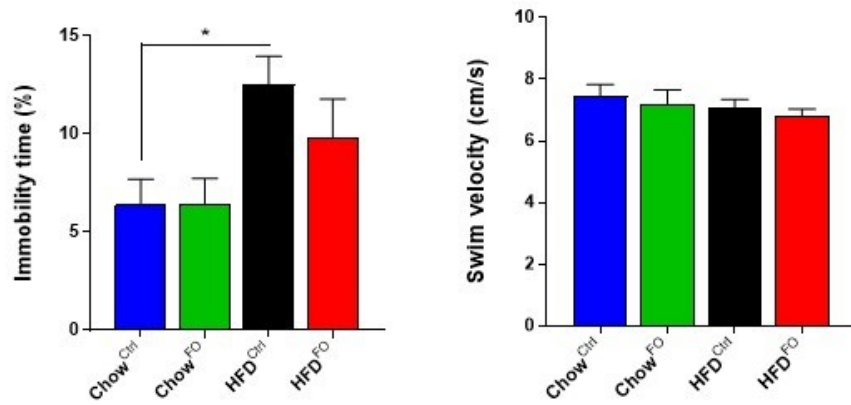
**B**

**Light/Dark Box**

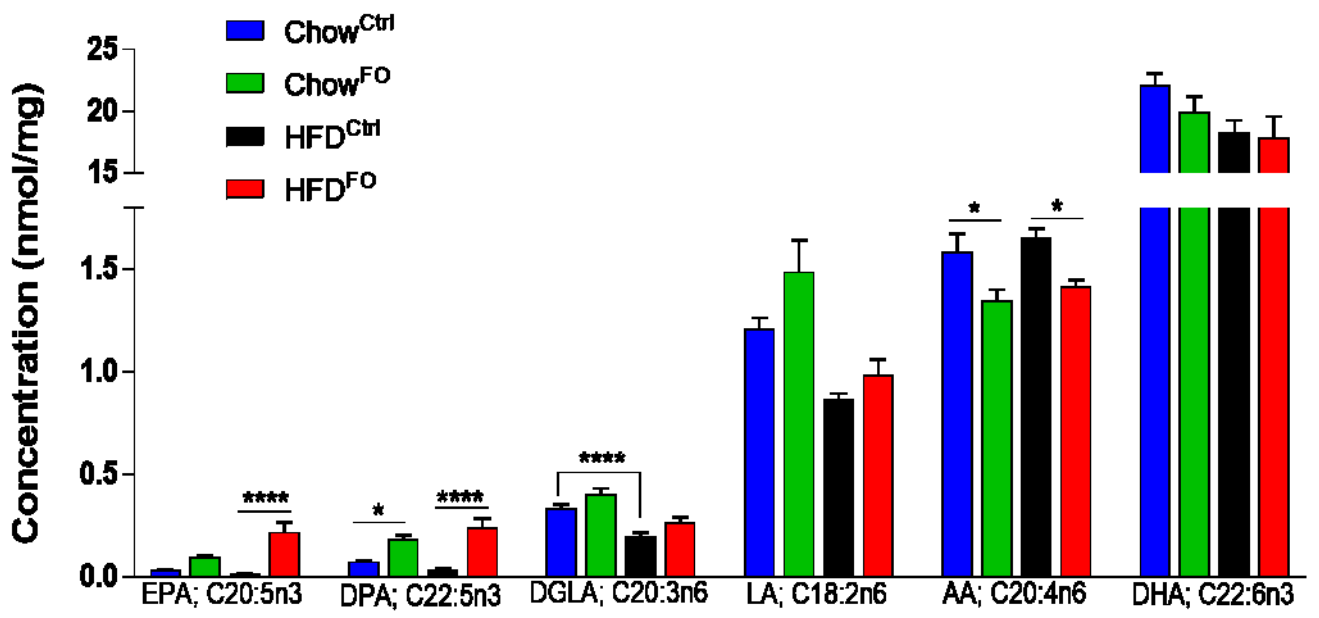


**C**

**Forced Swim Test**



**Figure 3**

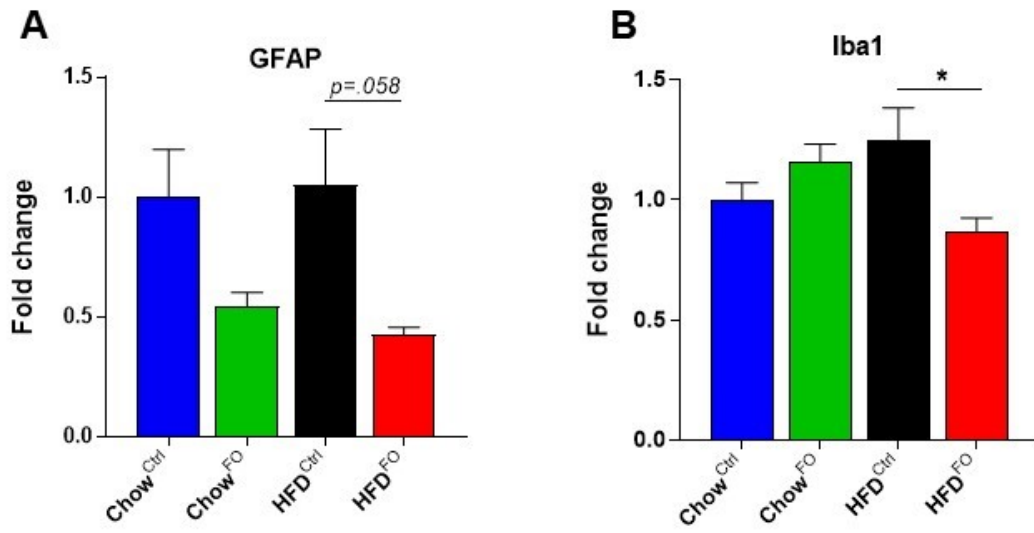


**Table 2**

Brain FA composition (nmol/mg)		Chow <sup>Ctrl</sup>	Chow <sup>FO</sup>	HFD <sup>Ctrl</sup>	HFD <sup>FO</sup>
Myristic acid	C14:0	0.25 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.34 ± 0.13 ##
Palmitic acid	C16:0	31.97 ± 4.78	32.36 ± 1.57	31.96 ± 1.91	34.38 ± 1.76
Palmitoleic acid	C16:1 n-7	0.72 ± 0.11	0.75 ± 0.1	0.65 ± 0.11	0.61 ± 0.13
Stearic acid	C18:0	42.12 ± 11.65	43.1 ± 10.95	46.37 ± 9.96	58.39 ± 11.65
Oleic acid	C18:1 n-9	49.55 ± 7.33	51.97 ± 6.63	49.79 ± 5.3	57.24 ± 4.16
Vaccenic acid	C18:1 n-7	4.63 ± 0.44	4.29 ± 0.57	4.27 ± 0.61	3.66 ± 0.56
Mead acid	C20:3 n-9	0.22 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.35 ± 0.05 ****	0.33 ± 0.05
Ratio n-3/n-6		7.33 ± 0,56	6.97 ± 2,5	7.31 ± 1,34	10.46 ± 5,58
Total% SFA		48.87 ± 4.48	43.74 ± 18.77	50.9 ± 4.2	47.65 ± 20.89
Total% MUFA		35.96 ± 2.48	34.67 ± 14.48	35.6 ± 3.1	32.25 ± 13.23
Total% PUFA		16.27 ± 1.08	15.15 ± 6.07	13.3 ± 0.7 *	12.0 ± 5.25



**Figure 4**



## Supplemental 1

**A**

	Chow	HFD
Fat source	Soybean oil	Palm oil
Fat (g/kg)	70	270
Casein (g/kg)	200	200
L-Cystine (g/kg)	3	3
Sucrose (g/kg)	100	100
Cornstarch (g/kg)	397.5	197.5
Dyetrose (g/kg)	132	132
Mineral Mix (g/kg)	35	35
Vitamin Mix (g/kg)	10	10
% Kcal Fat	17	50
% Kcal carbohydrates	62	43
% Kcal proteins	21	7
Total Kcal/g	3.8	4.8
% palmitic acid (C16:0)	10.2	44.5
% stearic acid (C18:0)	4.5	4.2
% oleic acid (C18:1)	22.7	39.4
% linoleic acid (C18:2)	54.8	9.5
% linolenic acid (C18:3)	7.8	N/A
% saturated fat	15	51.1
% monounsaturated fat	23.4	38.8
% polyunsaturated fat	61.2	9.7
N/A data not available		

## Figure Legend

Table 1 Fatty acid composition corn and fish oil supplements.

Table 2 Brain fatty acids composition (% of total fatty acids) after 15 weeks of high-fat feeding and 5 weeks of omega-3 supplementation.

SFA: saturated fatty acids; MUFA: mono-unsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids. Values are expressed as the mean concentration of fatty acids  $\pm$  SEM; Two-way ANOVA, Tukey post hoc; \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ . vs chow<sup>Ctrl</sup>, # vs HFD<sup>Ctrl</sup>.

Figure 1 Omega-3 supplementation protects against impaired glucose tolerance driven by a high-fat diet without inducing changes in body composition, energy expenditure and plasmatic metabolic parameters.

(A) Body weight progression during 15 weeks of low-fat diet (chow) or high saturated fat diet and during 5 weeks of daily gavage with corn oil (ctrl) or fish oil (FO). (B) Body fat and lean mass composition. (C) Cumulative calorie intake for 15 weeks before and during daily gavage for 5 weeks. (D-E) Ambulatory activity, (F-G) Respiratory exchange ratio (RER) and (H) energy expenditure corrected by metabolic mass over a 24-hour period in metabolic chambers (CLAMS). (I) Plasma glucose concentration following an intraperitoneal injection of dextrose (2 g/kg). (J) Plasma levels of insulin at time of sacrifice. Values are expressed as group mean  $\pm$  SEM; Two-way ANOVA, Tukey post hoc; \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ . N=9-12/condition.

Figure 2 Omega-3 supplementation rescues the exploratory deficit and anxiety-like behavior induced by a high-fat diet in the elevated plus maze and the light dark box test respectively.

(A) Number of entries in the open arms, percentage of time spent in the open arms and distance travelled in the elevated-plus maze. (B) Total entries and percentage of time spent in the lit compartment of the light/dark box. (C) Immobility time and swim velocity in the forced swim test. Values are expressed as group mean  $\pm$  SEM; Two-way ANOVA, Tukey post hoc; \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ . N=9-12/condition.

Figure 3 Brain fatty acid composition is altered after 20 weeks of high-fat feeding and 5 weeks of fish oil supplementation.

EPA: Eicosapentaenoic acid; DPA: Docosapentaenoic acid; DGLA: Dihomo- $\gamma$ -linolenic acid; LA: Linoleic acid; AA: Arachidonic acid; DHA: Docosahexaenoic acid. Values are expressed as the mean concentration of fatty acids  $\pm$  SEM; Two-way ANOVA, Tukey post hoc; \*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ . N=4-12/condition.

Figure 4 Omega-3 supplementation rescues reactive gliosis induced by a saturated high-fat diet.

(A) Relative gene expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and (B) ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) of whole brain sample measured by RT-PCR. Values are expressed as group mean  $\pm$  SEM; fold change vs chow<sup>Ctrl</sup> for all genes; Two-way ANOVA, Tukey post hoc; \*  $p \leq 0.05$ . N=9-12/condition.

Supplemental 1 Diet composition

## Chapitre 3: Article 2 (non publié)

### Microglial GPR120 activation protects against neuroinflammation and associated behavioral alterations

Geneviève Demers<sup>1,2,6</sup>, Arturo Israel Machuca-Parra<sup>1,3,6</sup>, Diane Bairamian<sup>1,2,6</sup>, Khalil Bouyakdan<sup>1</sup>, Zahra Dashtehei Pour<sup>1,2,6</sup>, Demetra Rodaros<sup>1</sup>, Nathalie Arbour<sup>1,4,6</sup>, Cyril Laurent<sup>1,4,6</sup>, Guillaume Ferreira<sup>7</sup>, Stephanie Fulton<sup>1,2,6\*</sup> and Thierry Alquier<sup>1,5,6\*</sup>

<sup>1</sup>Montreal Diabetes Research Center and Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Departments of: <sup>2</sup>Nutrition, <sup>3</sup>Biomedical Sciences, <sup>4</sup>Neuroscience, <sup>5</sup>Medicine, <sup>6</sup>Université de Montréal, Montréal QC H3T1J4, Canada.

<sup>7</sup>INRA, Nutrition and Integrative Neurobiology, Université de Bordeaux, UMR 1286, Bordeaux, France. \* Equal contribution

#### Corresponding author:

Thierry Alquier, PhD  
Centre de Recherche du CHUM  
900 rue Saint-Denis, 8-428  
Montréal, QC H2X 0A9  
Canada

## **Acknowledgments**

This work was supported by grants from the Société Francophone du Diabète (SFD), Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS), Cardiometabolic, Obesity and Diabetes research network (CMDO) and Merck Sharp Dohme Corp. SF and TA held FRQS salary awards and G.D. was supported by a FRQS fellowship.

## **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Abstract

GPR120 is a G protein-coupled receptor for long-chain fatty acids, including omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3) that are known to have beneficial effects on inflammation, metabolism and emotional states. GPR120 partly mediates the anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects of n-3 in peripheral tissues, findings that are generating considerable interest in GPR120 as a therapeutic target. Despite these results, the role of brain GPR120 is largely unknown. The aim of this study was to characterize the expression pattern of brain GPR120 and to investigate its potential role in neuroinflammatory responses both *in vitro* and *in vivo*. First, using primary cultures and FACS-purified neural cells, we found that GPR120 is predominantly expressed in microglia of neonatal and adult mouse brain. Second, GPR120 activation by a selective agonist (compound A; cpdA) greatly attenuated lipopolysaccharide (LPS)-induced morphological changes and the expression and secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) of primary microglia. Finally, central administration of cpdA alleviated the locomotor and anxiogenic effects of LPS. Collectively, these findings suggest that GPR120 plays a key role in neuroimmune function by offsetting microglia inflammatory responses and related behavioral changes. GPR120 could contribute to the protective effects of n-3 at the neural and behavioral levels and may also hold promise as a target for treating neuroinflammatory conditions associated with obesity.

**Keywords** Microglia, GPR120, LPS-induced inflammation, anxiety, sickness behavior.

## Highlights

- GPR120 is predominantly expressed in microglia throughout the mouse brain
- GPR120 activation reduces LPS-induced pro-inflammatory responses in primary microglia
- Central GPR120 activation prevents LPS-induced anxiety and sickness behaviors

## Introduction

GPR120, also known as free fatty acid receptor 4 (FFA4), is a G protein-coupled receptor preferentially activated by long-chain fatty acids including omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3)<sup>1</sup>. Present in peripheral macrophages, GPR120 has been shown to mediate the anti-inflammatory effects of n-3<sup>2</sup>. In addition, diet-induced obese mice receiving a GPR120 specific agonist (compound A, cpdA) exhibit reduced metabolic inflammation and improved glucose homeostasis<sup>3</sup>, and thus GPR120 has garnered much attention as a potential target for the treatment of metabolic disorders<sup>2</sup>. In addition to macrophages, GPR120 expression is reported in immortalized neurons<sup>4</sup> and microglial cells<sup>5</sup>, however relative expression by neural cell type remains to be characterized. In view of the role of GPR120 on macrophages in the resolution of systemic inflammation, we investigated the implication of GPR120 in neuroimmune activity.

Pro-inflammatory mediators generated in the periphery also impact the brain to give rise to physiological, metabolic, and behavioral responses that help wear off pathogens. To mimic aspects of infection, a systemic immune challenge widely used is lipopolysaccharide (LPS). Activation of the peripheral innate immune system by LPS is known to induce elevation of pro-inflammatory cytokines in the brain<sup>6-13</sup>. Elevated expression of inflammatory cytokines in the brain by LPS or chronic low-grade inflammatory states like obesity are associated with sickness and/or anxiodepressive behaviors<sup>14-17</sup>. Previous studies suggest that microglial cells play a central role in mediating neural and behavioral changes associated with systemic infections<sup>18-20</sup>. Microglia cells are sentinels involved in both innate and adaptive immune responses in the brain, and excessive and/or prolonged microglial activation has been associated with anxiodepressive behaviors<sup>21</sup>.

This present study aimed to determine: (1) the cellular expression of GPR120 in the brain; (2) the effects of a specific GPR120 agonist (cpdA) on LPS-induced



neuroinflammation both *in vitro* and *in vivo*, and (3) the effects of cpdA on LPS-induced anxiodepressive-like and sickness behaviors in mice.

## Methods

### Animals

All experiments were approved by the Institutional Animal Care Committee of the CRCHUM in accordance with the standards of the Canadian Council on Animal Care. Nine to ten-week-old *C57Bl/6* male mice from Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) were used for gene expression and secretion measurements experiments as well as for *in vivo* experiments. Eight to ten-week-old *CX<sub>3</sub>CR1* mice from Jackson were used for fluorescence-activated cell sorting (FACS). All animals were maintained in an environmentally controlled room (22–24°C) with *ad libitum* access to standard chow and water. Mice were acclimatized to a reverse light/dark cycle for at least seven days prior to initiation of experiments.

### Compounds

LPS from *Escherichia coli* (L-4516, serotype 0127:B8) was purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) and aliquoted for a single freeze-thaw. Compound A (cpdA) was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). CpdA was selected for its high affinity and selectivity for GPR120<sup>3</sup>. On testing days, cpdA and LPS were freshly dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) + 16% dimethylsulfoxide (DMSO) and saline respectively. For cell culture, cpdA was dissolved in ethanol (100%) for stock solution at 100 mM and diluted in the culture media to a final concentration of 10 μM (final ethanol concentration; 1/1000; also diluted in control condition).

### Microglial Cell Culture Isolation and Treatment

Primary cultures of microglial cells were derived from male and female wild type pups (P1-P2 postnatal day) (Supplemental information 1A). Briefly, after decapitation and meninges removal, brains were dissected and mechanically dissociated. Mixed glial cells were cultured in T75 flask and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 25mM of glucose and supplemented with 10% heat-inactivated

Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% of antibiotics (Penicillin G (10,000U/ml)-Streptomycin Sulfate (10,000 µg/ml) at 37°C in 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>. Media was changed twice per week (every three days) to reach astrocytes confluence (10-14 days). Subsequently, microglia start growing on top of a single layer of astrocytes as small rounded cells. To obtain purified and healthy microglia, the mix culture was ceased as soon as microglia floated in the media and while the astrocytes remained attached to the bottom. Primary microglia were finally harvested by removing the supernatant (without shaking, centrifuging or enzymatic solution) and cultured in 24-well plates for a maximum of five days prior to treatment to increase cell adhesion. The purity of the isolated microglia was > 95% for Iba-1 as determined by real time PCR (RT-PCR). To compare the expression of GPR120 in different brain cell types, primary astrocytes and a neuronal hypothalamic cell line (N46) were used. For the GPR120 agonist treatment, microglial cells were cultured in the media without FBS for 24h. Microglial cells were exposed to cpdA (10µM) or its vehicle (DMSO) 1h before adding either LPS (100 ng/ml), as a positive control for inflammation, or PBS (LPS vehicle) for 6h<sup>3</sup>. As cpdA may rapidly react with albumin, serum-free medium was used in these steps. Finally, supernatants were harvested for ELISA and cells were processed for RNA extraction.

### Microglial Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)

As detailed by *Legroux et al., 2015*<sup>22</sup>, deeply anesthetized adult male *CX<sub>3</sub>CR1* mice were perfused with 50ml of saline 0,9% (w/v). Brains were collected in hibernate medium (Life technologies, Burlington, ON, Canada) and kept on ice. Organs from pooled mice (n=3) were finely minced with a scalpel followed by a 15 min digestion with a mixture of collagenase D (2mg/mL, Roche Diagnostic) and DNase I (14µg/mL, Roche Diagnostic) in a water-bath at 37°C. After homogenization and centrifugation by Percoll™ to remove myelin, microglial cells were isolated using a CD11b positive (remove no microglial brain cells) selection kit according to the instructions provided by the manufacturer (Stemcell Technologies, #18000). After, CD11b positive cells were incubated with blocking solution (0.02µg/mL of rat anti-mouse CD16/CD32, BD

Bioscience) and FACS buffer was added (PBS+1%FBS+0.1% Sodium azide) containing PEcy7-conjugated antibody recognizing mouse CD45 prior to cell sorting (Microglial cells are CD45<sup>int</sup>CD11b<sup>+</sup> and macrophages are CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>). The gene encoding CreER for *CX<sub>3</sub>CR1* mice was followed by an IRES-EYFP element<sup>23</sup>. This insertion, as already observed<sup>24</sup>, revealed that EYFP<sup>+</sup> cells were Iba1<sup>+</sup> that allows microglial-YFP<sup>+</sup> cell sorting (Microglial-YFP sorting is based on CD45<sup>int</sup> YFP<sup>+</sup>) from adult mice (Figure 1B). Data were acquired on an Arya III flow cytometer and data were analyzed using Diva software (BD Biosciences).

### Immunohistochemistry

To evaluate microglial morphology changes induced by LPS treatment, we performed Iba-1 immunohistochemistry revealed by Vectastain Elite ABC HRP kit using DAB (3,3'-diaminobenzidine) peroxidase (HRP) substrate (with nickel) purchased from Vector Laboratories (CA, USA). After treatment, microglia cell cultures were post-fixed in 4% paraformaldehyde. After blockage of endogenous peroxidase (30 minutes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% + 0,3% normal goat serum (NGS)) and blockage of non-specific sites (30 minutes in 3% NGS + 0,1% Triton + 0,02% Azide in PBS 1X). Samples were blocked and incubated with primary antibodies overnight (3% NGS + 0,1% Triton + 0,02% Azide in PBS 1X + Iba1:500 ; 1 ug/ml ; Wako chemicals, Richmond, VA, USA) at 4°C followed by 2 h incubation at 22°C with a secondary biotinylated anti rabbit IgG antibody (provided in the DAB kit: vector BA-1000 (rabbit)). After the incubation with the peroxidase substrate solution and dehydration, coverslips were mounted and imaged with a Zeiss fluorescent microscope (Carl Zeiss AG, Jena, Germany) at a 20-fold magnification. Morphometric analysis of microglia images (Zeiss AxioImager.M2 ApoTome.2) were converted to 8-bit and measured using the “analyze particles” function of ImageJ. The total number of processes per cell was counted and the length of each process was measured, from the border of the soma to the end of the process.

## Quantitative PCR

For *in vivo* experiments, nucleus accumbi were microdissected from fresh brain sections and immediately frozen on dry ice before RNA extraction using TRIzol (Invitrogen). For cell culture, TRIzol was directly added into the wells (75-90% cell confluence). RNA concentration was quantified spectrophotometrically, and 1000 ng of total RNA was reverse-transcribed by M-MuLV reverse transcriptase (Invitrogen) with random hexamers following the manufacturer's conditions. The reaction mix was then diluted fivefold before use. Quantitative gene expression was measured from 1:5 cDNA dilutions. RT-PCR were performed using the QuantiFast SYBR Green PCR kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's guidelines on a Corbett Rotor-Gene 6000. Quantitative real-time PCR for GPR120, GFAP, NeuN, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, Iba-1 and 18S were performed using primers from Qiagen (<http://www.qiagen.com/products/pcr/quantitect/primerassays.aspx>). Relative gene expression was calculated using the  $\Delta\Delta CT$  method using 18S as the housekeeping gene. Each PCR reaction was performed in triplicate. Experiments were performed as indicated using the following primer sequences.

<b>Gene</b>	<b>Primer sequences</b>
18S	F: TAG CCA GGT TCT GGC CAA CGG R: AAG GCC CCA AAA GTG GCG CA
GPR120	F: TTT ACA GAT CAC GAA AGC ATC GC R: GTG CGG AAG AGT CGG TAG TC
Iba1	F: GGA TTT GCA GGG AGG AAA AG R: TGG GAT CAT CGA GGA ATT G
GFAP	F: AAC GAC TAT CGC CAA CTG R: CTC TTC CTG TTC CGC CAT TTG
NeuN	F: CCA GGC ACT GAG GCC AGC ACA CAG C R: CTC CGT GGG GTC GGA AGG GTG G
IL-1 $\beta$	F: GAC CCC AAA AGA TGA AGG GCT

IL-6      R: ATG TGC TGC TGC GAG ATT TG  
           F: CAG AGT CCT TCA GAG AGA TAC  
           R: AGC TTA TCT GTT AGG AGA GC  
 TNF- $\alpha$     F: CAC GCT CTT CTG TCT ACT G  
           R: AAG ATG ATC TGA GTC TGA GG  
 MCP1     F: ATT GGG ATC ATC TTG CTG GT  
           R: CCT GCT GTT CAC AGT TGC C

## ELISA

After starvation and exposure to cpdA and LPS, microglial cell culture media (75-90% confluency) was collected before the addition of TRIzol and immediately frozen. Murine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 cytokines were measured using the antibodies and reference standards contained in R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) Duokits enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to the manufacturer's protocol.

## Behavioral Tasks

To assess the behavioral effects of central agonism of GPR120 in an acute model of inflammation, male mice were injected IP with LPS (0.83 mg/kg) after receiving daily intracerebroventricular (ICV) injections of cpdA (10  $\mu$ g/day) or its vehicle (DMSO) during three consecutive days. The cpdA dose was selected based on Oh et al.<sup>2</sup> and was adapted for ICV administration (peripheral vs ICV dose ratio: 10:1)<sup>3</sup>. On day 3, mice were euthanized 2h (gene expression studies) or 12h (behavior studies) after the LPS injection. The LPS dose was chosen based on a report showing it is the minimal effective dose to induce anxiety and depressive-like behavior<sup>25</sup>. Control mice received an IP injection of endotoxin-free saline solution (0.9 %).

## Light/Dark Box Task

Light/dark box (LDB) was used to assess anxiety-like behavior. The apparatus (Med Associates, Inc.) consisted of an illuminated compartment made of transparent plastic and a dark compartment made of black plastic, covered by a lid (both 13.7 cm X 13.7

cm X 20.3 cm). The two boxes were separated by a partition wall with an opening at the bottom to allow the animal to pass freely between compartments. Number of entries and time spent in the lit compartment of the box were measured by an overhead video camera connected to a PC with Ethovision XT software (Med Associates, Inc.) for a period of five minutes.

### Elevated-Plus Maze Task

As previously reported, the elevated-plus maze (EPM) was used to assess anxiety-like behavior<sup>26</sup>. In brief, each mouse was placed in the center of the maze facing an open arm opposing the experimenter. Distance travelled, velocity and percentage of time spent in open arms were measured by an overhead video camera connected to a PC with Ethovision XT software (Med Associates, Inc.) for a period of five minutes.

### Intracerebroventricular Cannula Implantation

Animals were individually housed one week prior to ICV cannula implantation. Mice were anesthetized with isoflurane (as inhalant: 3% induction; 1–2% maintenance) and positioned in a stereotaxic apparatus (Kopf Instruments). A single ICV cannula (guide cannula: C315GS-5-SP, 5 mm, 26 gauge, Plastics One) was implanted into the right cerebral ventricle using stereotaxic coordinates (+0.5 mm caudal and +1 mm lateral; -1.4 mm ventral from dura). The cannula was secured to the skull with cyanoacrylate glue and dental cement and closed with an adapted dust cap (Dummy cannula: C315DCS-5-SPC, 5 mm, Plastics One). Correct positioning of the cannula was verified seven days after surgery by the drinking response elicited by an ICV injection of angiotensin II (20 ng/μL; Sigma). Behavioral testing and sacrifices were performed at the end of the light cycle and during the dark cycle, respectively. Mice were decapitated under isoflurane anesthesia. Brains and blood samples were harvested and stored at -80°C.

## Statistical Analyses

All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed using GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA). Intergroup comparisons were performed by ANOVA with Bonferroni post hoc test as described in figure legends.  $p < 0.05$  was considered significant.



## Results

### GPR120 is predominantly expressed in microglia

GPR120 was highly enriched in cultured microglial cells obtained from newborn mouse pups compared to primary astrocytes and a neuronal cell line (Figure 1A). In adult mice, microglial-YFP cells were sorted by FACS (Figure 1B). GPR120 expression is highly expressed in the YFP<sup>+</sup> cell fraction (microglial cells confirmed by Iba1 expression), and absent in the negative fraction containing astrocytes and neurons (assessed by GFAP and NeuN expression respectively; Figure 1B).

### GPR120 activation attenuates morphological signs of microglial activation

Using chromogen-based immunohistochemistry of the specific microglial marker Iba1, we found that LPS inhibits microglial process retractions (Figure 2A) as suggested by a lower percentage of cells with processes (32% LPS vs 80% control; Figure 2B), a feature characteristic of active amoeboid cells. Morphological changes induced by LPS were not associated with alteration of cell processes length (Figure 2C). LPS did not reduce number of processes per cell compared to control (Figure 2D). Pro-inflammatory morphological changes induced by LPS were attenuated by GPR120 activation (Figure 2A) as cpdA increased the number of cells with processes by 60% compared to LPS (Figure 2B) and the number of processes per cell by 32% (Figure 2D).

### GPR120 activation decreases LPS-induced microglial inflammatory markers

In cultured microglial cells, LPS treatment significantly increased mRNA expression of pro-inflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1; Figure 3 A, C, E, G, H). LPS application also

increased IL-6 and TNF- $\alpha$ , but not IL-1 $\beta$  protein secretion (Figure 3 B, D, and F). Pre-treatment with the GPR120 agonist, cpdA, reduced LPS-induced expression IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and MCP-1, without eliciting changes in Iba1 expression (Figures 3 A, C, E, G, H). cpdA application decreased IL-6 and TNF- $\alpha$ , but not IL-1 $\beta$  protein secretion (Figure 3 B, D, F). Together, these results indicate clear anti-inflammatory effects of GPR120 activation.

#### Central GPR120 activation inhibits LPS-induced sickness behaviors

We then evaluated whether cpdA could also have an anti-inflammatory effect *in vivo*. Systemic LPS administration did not significantly increase mRNA expression of Iba1, IL-6 or IL-1 $\beta$  2-hour post-injection in the nucleus accumbens (NAc) (Figure 4A). On the other hand, intracerebroventricular pretreatment with cpdA did not reach statistical significance in reducing IL-6 and IL-1 $\beta$  expression (Figure 4A).

We finally tested whether cpdA could alleviate the behavioral effects of systemic LPS on anxiety-like behaviors. In the light/dark box (LDB) test, LPS injection decreased the time spent in the anxiogenic lit compartment of the box (Figure 4B) and the number of entries in this compartment (Figure 4C). Intracerebroventricular pretreatment with cpdA strongly attenuated LPS-induced behavioral changes by demonstrating no significant difference between the control and cpdA injected group (Figure 4B-C). In the elevated plus test (EPM), another classical test to evaluate anxiety-like behaviors, cpdA prevented locomotor deficits induced by LPS, as demonstrated by distance and velocity measurements (Figure 4D-E) without affecting the time spent in anxiogenic open arm (Figure 4F). This suggests a clear effect of GPR120 agonist on LPS-induced sickness behavior more than on anxiety-like behaviors.

## Discussion

The present study provides the first evidence that brain GPR120 is enriched in microglial cells. Furthermore, activation of GPR120 by the specific agonist cpdA was effective in abrogating LPS-induced inflammation of primary microglia whereas central GPR120 activation suppressed sickness behaviors elicited by LPS.

Microglia morphology is highly associated with function<sup>27-29</sup> and microenvironment<sup>30,31</sup>. Here we established an association between GPR120 activation and a state of microglia surveillance. While LPS reduced the number of cell processes, leading to amoeboid shaped microglia, cpdA visibly blunted these characteristic microglia morphological changes (Figure 2C). Consistently, LPS-induced microglial IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and MCP-1 expression was reduced by cpdA treatment. Our results are in agreement with previous findings demonstrating the activation of expression and release of pro-inflammatory cytokines following an LPS administration<sup>9</sup>. We report here an absence of correlation between IL-1 $\beta$  expression and secretion levels. IL-1 $\beta$  does not follow the conventional ER-Golgi secretion mechanism, as opposed to IL-6 and TNF- $\alpha$ <sup>33</sup>. We can hypothesize that our results are consistent with other teams who have observed an excursion of IL-1 $\beta$  secretion, and this, minutely 2 hours after administration of LPS in primary microglia<sup>34</sup>.

Neuroinflammation is associated with a myriad of complications including sickness and depressive-like behaviors<sup>17,35</sup>. In animal studies, an infection induced through systemic administration of LPS activates the immune system to release pro-inflammatory cytokines like IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ . These cytokines mediate a pattern of responses termed sickness behaviors that includes weakness, hypolocomotion and increased anxiety and depressive-like behaviors<sup>7,35-39</sup>. We did not observe an increase in the expression of Iba-1, IL-6 and IL-1 $\beta$  in the nucleus accumbens of mice peripherally injected with LPS, and correspondingly, pretreatment with cpdA did not modulate inflammatory marker expression levels. However, there are several discrepancies in the current literature regarding the delay between LPS injection and tissue harvesting

in order to observe a neuroinflammatory response. Indeed, others observed significant differences in the pro-inflammatory cytokine expression excursion at 2h post-systemic injection of LPS<sup>40</sup>, while others observed differences at 24h post-injection<sup>41</sup>. For Iba1 specifically, Norden et al. also observed an increase in Iba1 expression minimally 12h post-peripheral injection of LPS, the cytokines being expressed much earlier<sup>42</sup>. The results of Norden et al. are in agreement with our results reinforcing the importance of using a combination of several parameters to describe microglial activation, which occurs upstream of cytokine expression. Nevertheless, considering the strong anti-inflammatory effects of cpdA *in vitro*, we argue that the beneficial anti-inflammatory effect of cpdA *in vivo* occur subsequent to the 2h time point. Also, it seems that the brain structures studied are crucial in determining the delay between injection and tissue harvesting. Indeed, many studies measured these inflammatory parameters in the hippocampus and prefrontal cortex<sup>40,41,43</sup> while this is the first to assess inflammation in the nucleus accumbens.

Several studies provide evidence that communication from the site of inflammation to the brain is systemically generated via a response in the perivascular macrophages and microglia<sup>37,44,45</sup>. In rodents, depressive-like behaviors, secondary to an elevation of pro-inflammatory cytokines, develop over a background of sickness behavior, similar to those observed in depressed patients<sup>35,36,38</sup>. Immune-to-brain communication also occurs in humans by generating mood changes that are associated with modified activity in particular brain regions, following systemic inflammation or infection<sup>46-48</sup>. While these modifications are part of an homeostatic process, it is increasingly evident that inflammation has a detrimental effect in humans suffering from chronic mental disorders<sup>49,50</sup>. Finally, previous data showed that microglia become primed by ongoing mood disorders, which increases their response toward subsequent inflammatory stimuli, including systemic inflammation<sup>51,52</sup>.

Also, peripheral cytokines promoted by LPS injection can access the central nervous system and increase the production of local inflammatory mediators including IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  by endothelial cells, perivascular macrophages, microglia and astrocytes<sup>53</sup>. Moreover, increased IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression in the brain is one of the hallmarks

of rodent depressive-like behavior enhanced by LPS<sup>54-57</sup>. In this way, several evidence highlights the major implication of the NAc in the response to stress<sup>58</sup> and the regulation of anxiety and depressive-like behavior<sup>59,60</sup> that are highly associated to neuroplasticity<sup>61</sup>. We previously found that prolonged chronic inflammation by high-fat feeding resulting in diet-induced obesity elicits anxiodepressive behavior and NAc molecular adaptations that correlate with the extent of behavioral despair<sup>53,61</sup>.

Although we did not observe significant difference in brain Iba1 and pro-inflammatory cytokine expression levels, we demonstrate that a LPS injection significantly evoked characteristics of sickness behaviors as evidenced by a decrease in velocity and distance travelled in the EPM as well as fewer entries and percentage of time spent in lit compartment of the LDB test. Even though decreased locomotor activity can be interpreted as anxiodepressive-like symptoms, results obtained may be more attributed to sickness behaviors. Nevertheless, cpdA treatment abolished LPS-induced locomotor impairments as evidenced by no difference in velocity and distance travelled in the EPM as well as in number of entries and percentage of time spent in the lit compartment of the LDB compared to vehicle-injected controls. Despite the absence of anti-inflammatory effect of cpdA at 2h post-injection, we argue that the robust behavioral modulation could be attributed to protective effects of cpdA in the brain, which minimally occur after the time point used for behavioral experiments.

## Conclusion

Taken together, this work demonstrates the enrichment of GPR120 in microglial cells and its capacity to moderate inflammatory responses. These findings identify GPR120 as a promising target for the prevention of microglia-mediated neuroinflammation. In a consistent manner, these results also suggest a role of central GPR120 agonism in the prevention of inflammation-related sickness behaviors. Collectively, this work implicates GPR120 targeting in moderating immune response following systemic inflammation and potentially offers an innovative therapeutic approach for neuroinflammation-associated diseases such as anxiety and depression. Further studies will be required to elucidate the role of GPR120 activation in the resolution of obesity and associated metabolic inflammation.

## References

1. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med.* 2005. doi:10.1038/nm1168
2. Oh DY, Walenta E, Akiyama TE, et al. A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat Med.* 2014. doi:10.1038/nm.3614
3. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, et al. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell.* 2010. doi:10.1016/j.cell.2010.07.041
4. Wellhauser L, Belsham DD. Activation of the omega-3 fatty acid receptor GPR120 mediates anti-inflammatory actions in immortalized hypothalamic neurons. *J Neuroinflammation.* 2014. doi:10.1186/1742-2094-11-60
5. Dragano NRV, Solon C, Ramalho AF, et al. Polyunsaturated fatty acid receptors, GPR40 and GPR120, are expressed in the hypothalamus and control energy homeostasis and inflammation. *J Neuroinflammation.* 2017. doi:10.1186/s12974-017-0869-7
6. Layé S, Parnet P, Goujon E, Dantzer R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994;27(1):157-162.
7. Kelley KW, Bluthé RM, Dantzer R, et al. Cytokine-induced sickness behavior. In: *Brain, Behavior, and Immunity.* ; 2003. doi:10.1016/S0889-1591(02)00077-6
8. Craft TKS, DeVries AC. Role of IL-1 in Poststroke Depressive-like Behavior in Mice. *Biol Psychiatry.* 2006. doi:10.1016/j.biopsych.2006.03.011
9. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(1):46-56. doi:10.1038/nrn2297
10. Abraham J, Jang S, Godbout JP, et al. Aging sensitizes mice to behavioral deficits induced by central HIV-1 gp120. *Neurobiol Aging.* 2008. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.11.002
11. D'Mello C, Le T, Swain MG. Cerebral Microglia Recruit Monocytes into the Brain in Response to Tumor Necrosis Factor Signaling during Peripheral Organ Inflammation. *J Neurosci.* 2009. doi:10.1523/JNEUROSCI.3567-08.2009
12. Shih RH, Yang CM. Induction of heme oxygenase-1 attenuates lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse brain endothelial cells. *J Neuroinflammation.* 2010. doi:10.1186/1742-2094-7-86

13. Shih R-H, Wang C-Y, Yang C-M. NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Front Mol Neurosci*. 2015. doi:10.3389/fnmol.2015.00077
14. Décarie-Spain L, Sharma S, Hryhorczuk C, et al. Nucleus accumbens inflammation mediates anxiodepressive behavior and compulsive sucrose seeking elicited by saturated dietary fat. *Mol Metab*. 2018;10:1-13. doi:10.1016/j.molmet.2018.01.018
15. Chen J, Buchanan JB, Sparkman NL, Godbout JP, Freund GG, Johnson RW. Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. *Brain Behav Immun*. 2008. doi:10.1016/j.bbi.2007.08.014
16. Godbout JP, Moreau M, Lestage J, et al. Aging exacerbates depressive-like behavior in mice in response to activation of the peripheral innate immune system. *Neuropsychopharmacology*. 2008. doi:10.1038/sj.npp.1301649
17. Huang Y, Henry CJ, Dantzer R, Johnson RW, Godbout JP. Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. *Neurobiol Aging*. 2008. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.012
18. Garden GA, Möller T. Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006. doi:10.1007/s11481-006-9015-5
19. Kraft AD, Jean Harry G. Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health*. 2011. doi:10.3390/ijerph8072980
20. Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2011. doi:10.1038/nri3086
21. Yirmiya R, Rimmerman N, Reshef R. Depression as a Microglial Disease. *Trends Neurosci*. 2015;38:637-658. doi:10.1016/j.tins.2015.08.001
22. Legroux L, Pittet CL, Beauseigle D, Deblois G, Prat A, Arbour N. An optimized method to process mouse CNS to simultaneously analyze neural cells and leukocytes by flow cytometry. *J Neurosci Methods*. 2015. doi:10.1016/j.jneumet.2015.03.021
23. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, et al. Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Mol Cell Biol*. 2000. doi:10.1128/MCB.20.11.4106-4114.2000
24. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, et al. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*. 2013. doi:10.1016/j.cell.2013.11.030
25. Martin SA, Dantzer R, Kelley KW, Woods JA. Voluntary Wheel Running Does Not Affect Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior in Young Adult



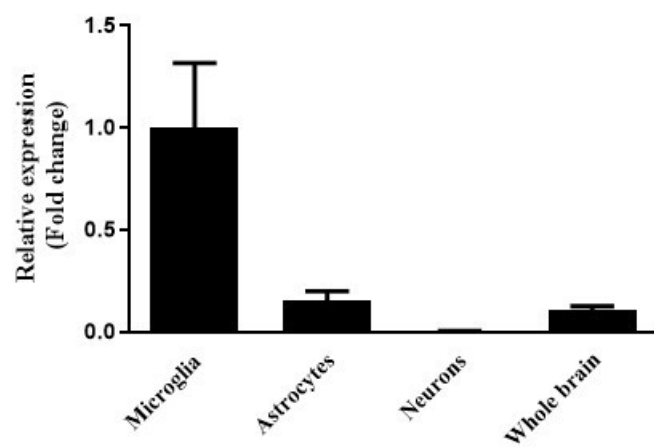
- and Aged Mice. *Neuroimmunomodulation*. 2014. doi:10.1159/000356144
26. Sharma S, Fulton S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *Int J Obes*. 2013. doi:10.1038/ijo.2012.48
  27. Suzumura A, Marunouchi T, Yamamoto H. Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Res*. 1991. doi:10.1016/0006-8993(91)91302-H
  28. Stence N, Waite M, Dailey ME. Dynamics of microglial activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*. 2001. doi:10.1002/1098-1136(200103)33:3<256::AID-GLIA1024>3.0.CO;2-J
  29. Szabo M, Gulya K. Development of the microglial phenotype in culture. *Neuroscience*. 2013. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.03.033
  30. Chamak B, Mallat M. Fibronectin and laminin regulate the in vitro differentiation of microglial cells. *Neuroscience*. 1991. doi:10.1016/0306-4522(91)90267-R
  31. Tam WY, Ma CHE. Bipolar/rod-shaped microglia are proliferating microglia with distinct M1/M2 phenotypes. *Sci Rep*. 2014. doi:10.1038/srep07279
  32. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(4):189-195. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.10.001
  33. O'Callaghan P, Li JP, Lannfelt L, Lindahl U, Zhang X. Microglial heparan sulfate proteoglycans facilitate the cluster-of-differentiation 14 (CD14)(WARNING)Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent inflammatory response. *J Biol Chem*. 2015;290(24):14904-14914. doi:10.1074/jbc.M114.634337
  34. Biesmans S, Meert TF, Bouwknecht JA, et al. Systemic Immune Activation Leads to Neuroinflammation and Sickness Behavior in Mice. *Mediators Inflamm*. 2013;14. doi:10.1155/2013/271359
  35. Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: Where do we stand? *Brain Behav Immun*. 2001. doi:10.1006/brbi.2000.0613
  36. Konsman JP, Parnet P, Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci*. 2002;25(3):154-159.
  37. Yuan T-F, Paes F, Arias-Carrión O, et al. Neural Mechanisms of Exercise: Anti-Depression, Neurogenesis, and Serotonin Signaling. *CNS Neurol Disord -Drug Targets*. 2015;14:1307-1311.
  38. Yeh C-H, Hsieh L-P, Lin M-C, et al. Dexmedetomidine reduces lipopolysaccharide induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. doi:10.1371/journal.pone.0191070
  39. André C, Diné AL, Ferreira G, Layé S, Castanon N. Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-

- induced depressive-like behavior: Focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation. *Brain Behav Immun*. 2014. doi:10.1016/j.bbi.2014.03.012
40. O'Connor JC, Lawson MA, André C, et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry*. 2009. doi:10.1038/sj.mp.4002148
  41. Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout JP. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*. 2016;64(2):300-316. doi:10.1002/glia.22930
  42. Jangra A, Lukhi MM, Sulakhiya K, Baruah CC, Lahkar M. Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behaviour in mice. *Eur J Pharmacol*. 2014. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.031
  43. Ek M, Engblom D, Saha S, Blomqvist A, Jakobsson PJ, Ericsson-Dahlstrand A. Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier. *Nature*. 2001;410(6827):430-431. doi:10.1038/35068632
  44. Yamagata K, Matsumura K, Inoue W, et al. Coexpression of Microsomal-Type Prostaglandin E Synthase with Cyclooxygenase-2 in Brain Endothelial Cells of Rats during Endotoxin-Induced Fever.
  45. Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, et al. Cytokine-Associated Emotional and Cognitive Disturbances in Humans. *Arch Gen Psychiatry*. 2001. doi:10.1001/archpsyc.58.5.445
  46. Krabbe KS, Reichenberg A, Yirmiya R, Smed A, Pedersen BK, Bruunsgaard H. Low-dose endotoxemia and human neuropsychological functions. *Brain Behav Immun*. 2005. doi:10.1016/j.bbi.2005.04.010
  47. Bucks RS, Gidron Y, Harris P, Teeling J, Wesnes KA, Perry VH. Selective effects of upper respiratory tract infection on cognition, mood and emotion processing: A prospective study. *Brain Behav Immun*. 2008. doi:10.1016/j.bbi.2007.09.005
  48. Cunningham C, Champion S, Lunnon K, et al. Systemic Inflammation Induces Acute Behavioral and Cognitive Changes and Accelerates Neurodegenerative Disease. *Biol Psychiatry*. 2009. doi:10.1016/j.biopsych.2008.07.024
  49. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, et al. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology*. 2009;73(10):768-774. doi:10.1212/WNL.0b013e3181b6bb95
  50. Cunningham C. Central and Systemic Endotoxin Challenges Exacerbate the Local Inflammatory Response and Increase Neuronal Death during Chronic Neurodegeneration. *J Neurosci*. 2005. doi:10.1523/JNEUROSCI.2614-05.2005
  51. Lunnon K, Teeling JL, Tutt AL, Cragg MS, Glennie MJ, Perry VH. Systemic Inflammation Modulates Fc Receptor Expression on Microglia during Chronic Neurodegeneration. *J Immunol*. 2011. doi:10.4049/jimmunol.0903833

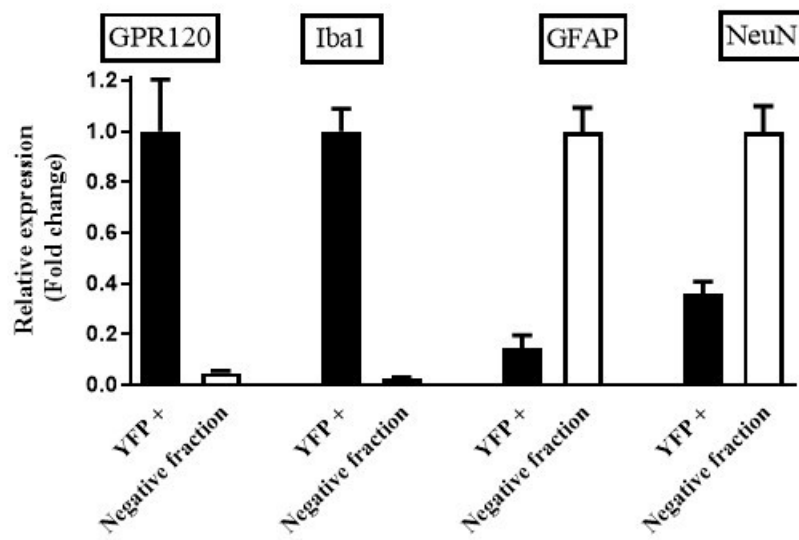
52. Décarie-Spain L, Sharma S, Hryhorczuk C, et al. Nucleus accumbens inflammation mediates anxiodepressive behavior and compulsive sucrose seeking elicited by saturated dietary fat. *Mol Metab.* 2018;10:1-13. doi:10.1016/j.molmet.2018.01.018
53. O'Connor JC, Lawson MA, Andre C, et al. Induction of IDO by Bacille Calmette-Guerin Is Responsible for Development of Murine Depressive-Like Behavior. *J Immunol.* 2009. doi:10.4049/jimmunol.0802722
54. Zhang Y, Liu L, Peng Y-L, et al. Involvement of inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced mice depressive-like behaviors. *CNS Neurosci Ther.* 2014;20(2):119-124. doi:10.1111/cns.12170
55. Aguiar-Valles A, Kim J, Jung S, Woodside B, Luheshi GN. Role of brain transmigrating neutrophils in depression-like behavior during systemic infection. *Mol Psychiatry.* 2014. doi:10.1038/mp.2013.137
56. Cazareth J, Guyon A, Heurteaux C, Chabry J, Petit-Paitel A. Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: Importance of CCR2/CCL2 signaling. *J Neuroinflammation.* 2014. doi:10.1186/1742-2094-11-132
57. Gold PW. The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. *Mol Psychiatry.* 2015. doi:10.1038/mp.2014.163
58. Williams ZM. Good vibrations with deep brain stimulation. *Nat Neurosci.* 2015;18(5):618-619. doi:10.1038/nn.4007
59. Francis TC, Lobo MK. Emerging Role for Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes in Depression. *Biol Psychiatry.* 2017. doi:10.1016/j.biopsych.2016.09.007
60. Russo SJ, Nestler EJ. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(9):609-625. doi:10.1038/nrn3381

**Figure 1**

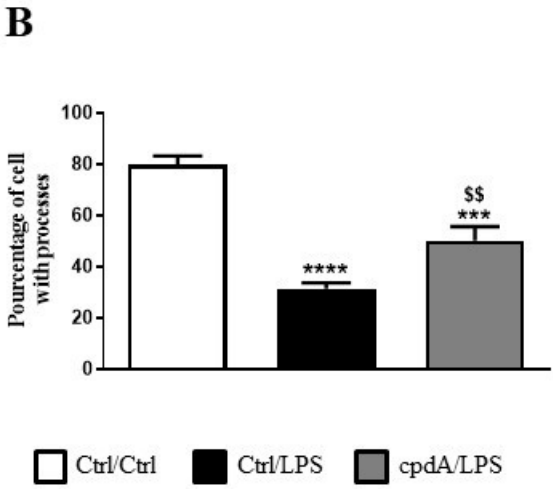
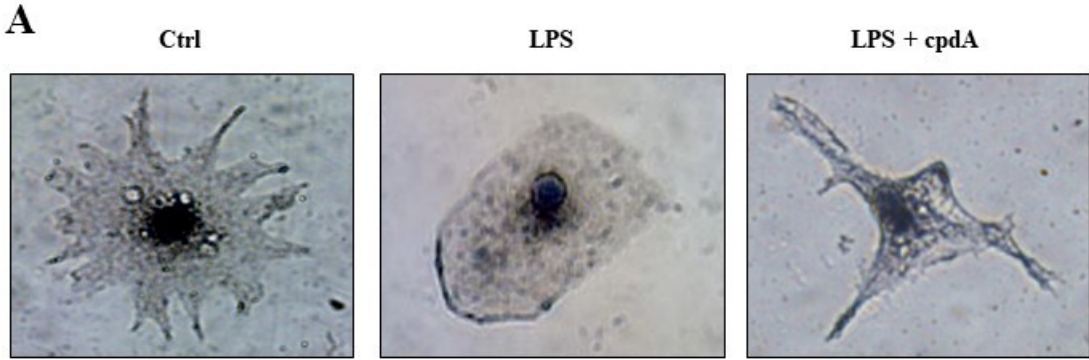
**A**



**B**



**Figure 2**



**C**



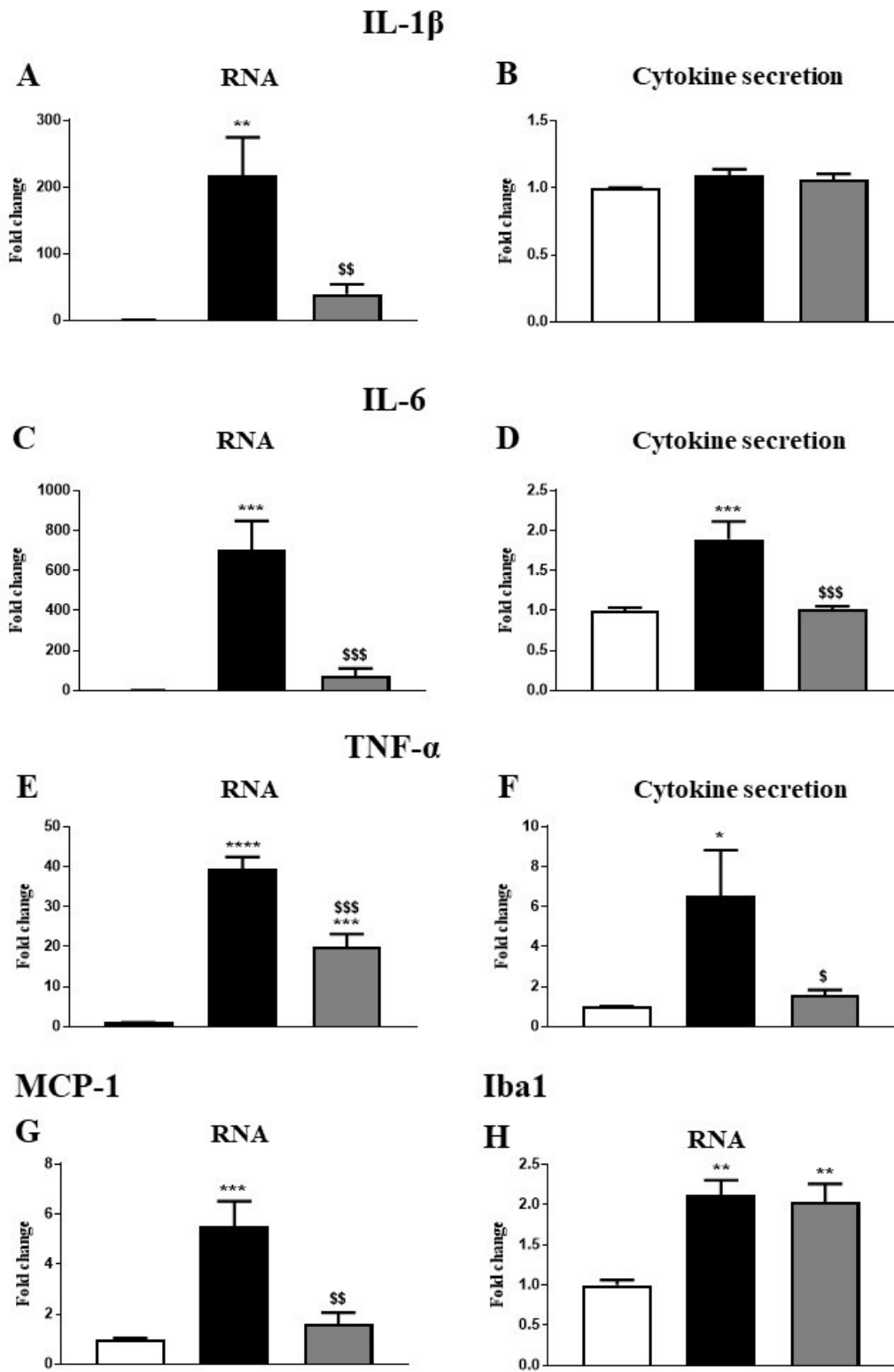
Condition	Length of processes (pixel)
Ctrl/Ctrl	~80
Ctrl/LPS	~85
cpdA/LPS	~95

**D**

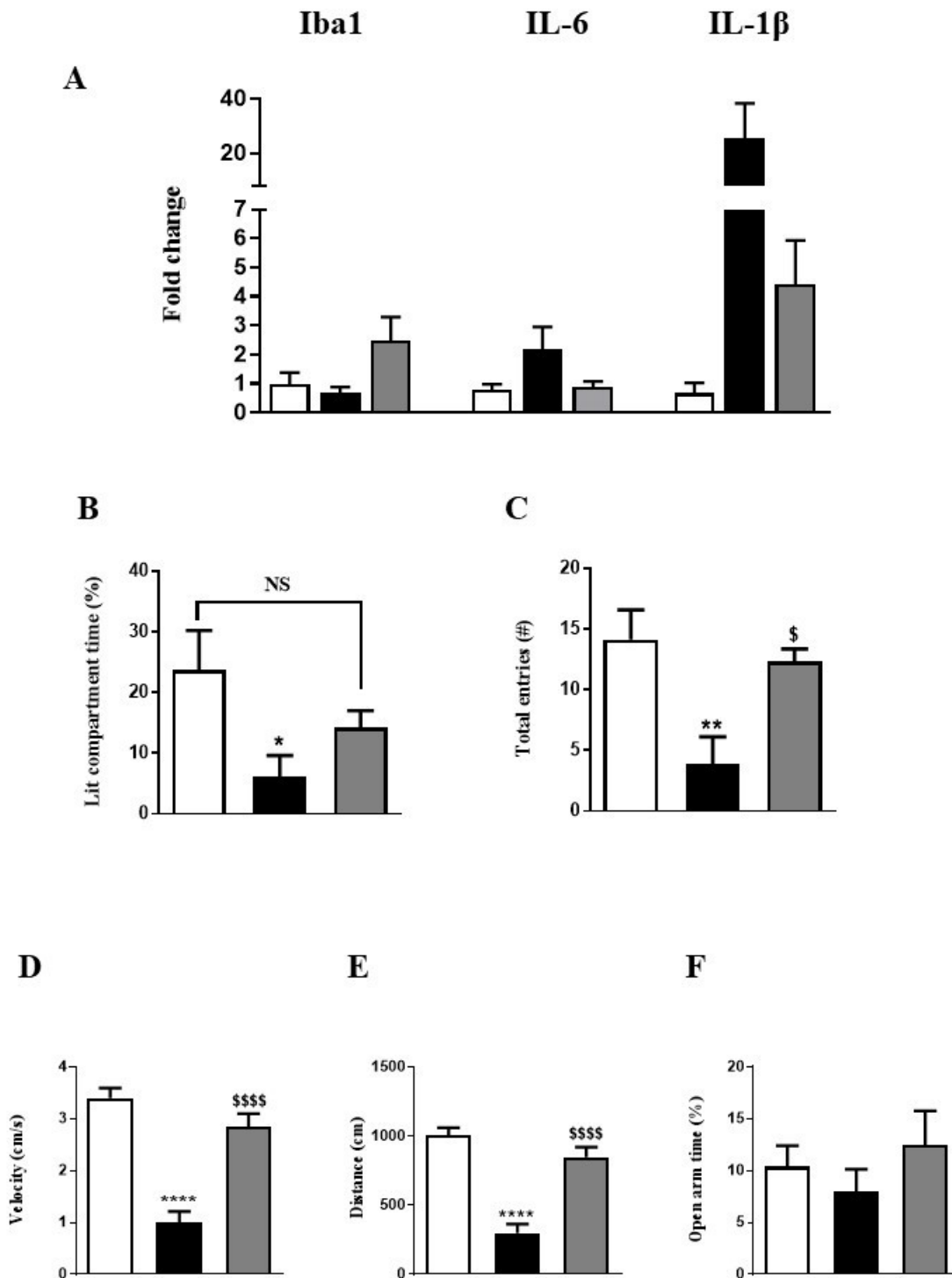


Condition	Number of processes per cell
Ctrl/Ctrl	~3.2
Ctrl/LPS	~2.6
cpdA/LPS	~3.4

**Figure 3**

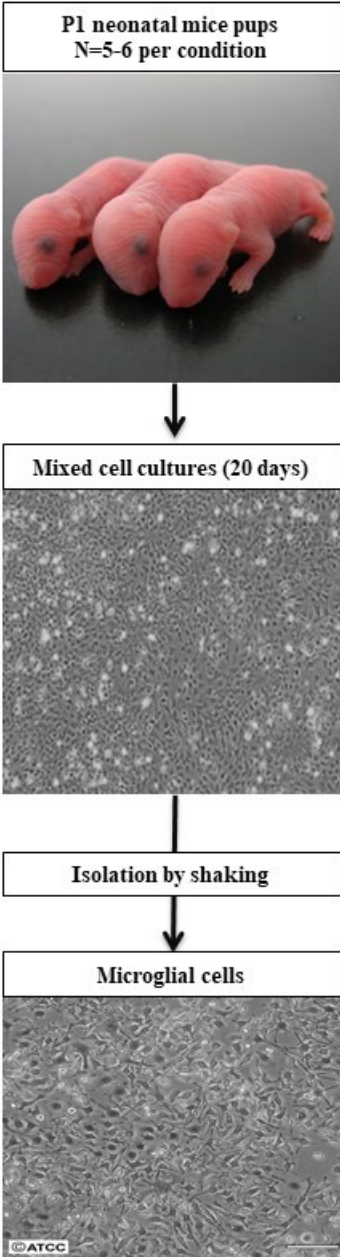


**Figure 4**

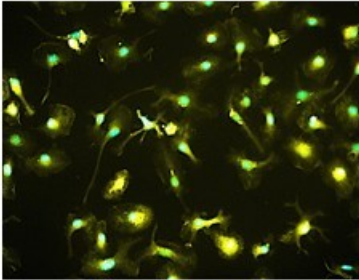


# Supplemental 1

A

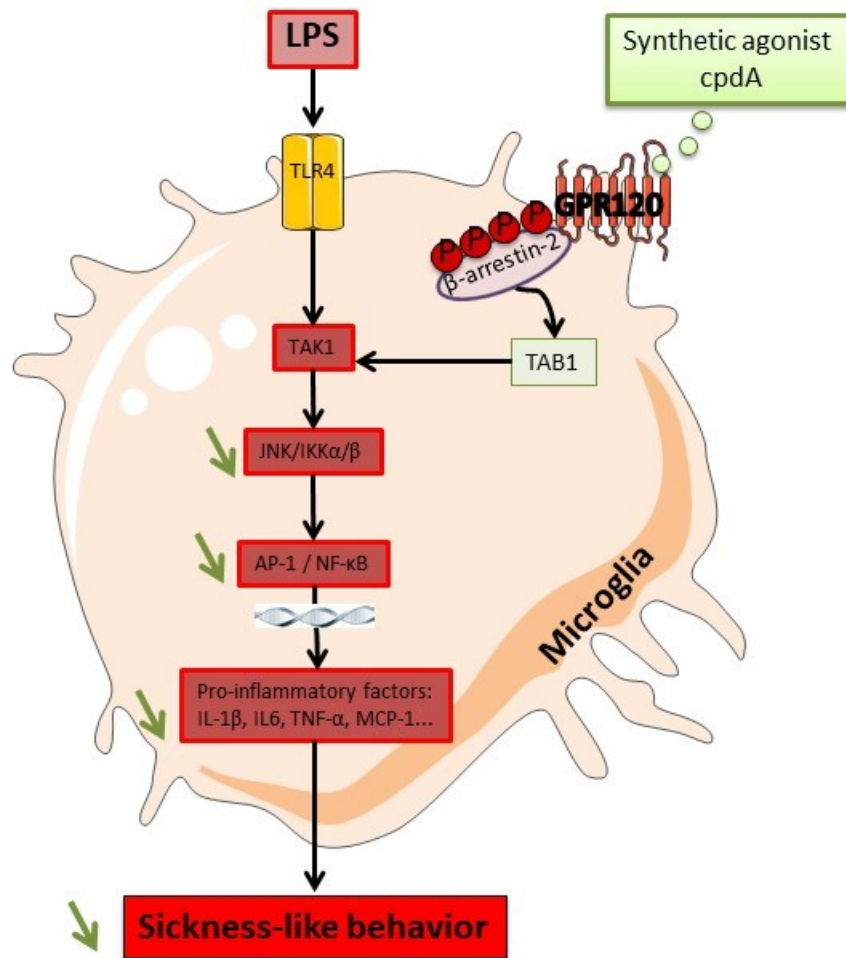


B





# Graphical abstract



## Figure Legend

Figure 1 GPR120 expression in neonatal and adult mouse brain.

(A) GPR120 RNA expression in primary microglia, primary astrocytes, immortalized hypothalamic neurons (N46) and whole brain by RT-PCR, (B) Expression of GPR120 and cell-type markers (Iba1, GFAP and NeuN for microglia, astrocytes and neurons respectively) from adult mice after cell sorting (YFP<sup>+</sup> and negative fraction). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM, fold change vs microglia (1A), vs YFP<sup>+</sup> for GPR120 and Iba1 gene marker and vs negative fraction for GFAP and NeuN gene marker (1B). N=4-6.

Figure 2 Effects of GPR120 activation on microglial morphology changes induced by LPS treatment.

(A) Image shows microglia after isolation or incubation of LPS and cpdA, (B) Percentage of cells with processes, (C) Length of processes and (D) Number of processes per cell. Results are expressed as group mean  $\pm$  SEM; One-way ANOVA, Bonferroni post hoc; \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$  vs Ctrl/ctrl, \$  $p \leq 0.05$ , \$\$  $p \leq 0.01$  vs Ctrl/LPS. N=7-9 for each coverslip condition (3 images by coverslip = 20 cells per image).

Figure 3 GPR120 activation downregulates LPS-induced pro-inflammatory gene expression and cytokines secretion in cultured microglia.

(A) Effect of GPR120 activation on LPS-induced gene expression of IL-1 $\beta$ , (C) IL-6, (E) TNF- $\alpha$ , (G) MCP-1, (H) Iba-1 and (B) Protein secretion of IL-1 $\beta$ , (D) IL-6 and (F) TNF- $\alpha$  in primary microglial cells derived from WT pups. Results are expressed as fold change vs Ctrl/ctrl  $\pm$  SEM; One-way ANOVA, Bonferroni post hoc; \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$  vs Ctrl/ctrl, \$ vs Ctrl/LPS. N=4-8 for each condition.

Figure 4 Central GPR120 activation blunts LPS-induced sickness behavior.

(A) Iba1, IL-6 and IL-1 $\beta$  gene expression in the NAc by RT-PCR, (B) Total entries, (C) Percentage of time spent in the lit compartment of the LDB test, (D) Velocity, (E) Distance travelled and (F) Percentage of open arm time in the EPM. Results are expressed as fold change vs Ctrl/ctrl (4A) and group mean (4B-4F)  $\pm$  SEM; One-way ANOVA, Bonferroni post hoc; \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$  vs Ctrl/ctrl, \$ vs Ctrl/LPS. N=5-9 for each condition.

### Supplemental 1

(A) Protocol for microglia cell culture from CX<sub>3</sub>CR1<sup>CreER/+</sup> and WT mouse pups and (B) CX<sub>3</sub>CR1<sup>CreER/+</sup> microglia cells expressing YFP<sup>+</sup>.

Graphical abstract: anti-inflammatory properties of GPR120 activation in microglial cells.

In microglia cells, activation of TLR4 by LPS mediates pro-inflammatory cascades by activating TAK1, Ikk $\beta$  and NF- $\kappa$ B. Finally, these cascades increase the expression and release of pro-inflammatory factors (IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ , etc.). In this study, we observed that the activation of GPR120 by cpdA inhibits LPS-induced inflammatory cascades by strongly decreasing cytokines expression and secretion. Microglial activation of GPR120 could explain diminution of sickness behavior in mice.

## Chapitre 4: Discussion

Nous avons d'abord rapporté dans l'article 1 qu'une exposition chronique à une diète riche en gras (HFD; de l'anglais *high fat diet*) saturés chez des souris mâles pour une durée de 15 semaines augmente significativement la prise de poids et la prise alimentaire comparativement à une diète faible en gras (*chow*). L'ajout complémentaire d'une supplémentation d'huile de poisson (FO; de l'anglais *fish oil*) ou d'huile de maïs (Ctrl) n'a pas semblé avoir d'impact sur le poids corporel des souris entre les groupes de diètes. Nous avons cependant remarqué une différence significative de la prise alimentaire chez les souris HFD<sup>FO</sup> comparativement au HFD<sup>Ctrl</sup> seulement qu'à la toute fin du traitement de gavage. Nous ne pouvons écarter l'impact de cet élément sur les résultats métaboliques et comportementaux observés dans cette étude, mais il ne peut certainement pas les expliquer dans leur entièreté.

Un des aspects fort intéressants de l'article 1 est qu'une dose d'n-3 représentative de celle utilisée chez les Humains a été administrée aux souris quotidiennement, en appliquant un facteur de conversion pour convertir des doses pharmacologiques de l'Humain vers l'animal[127]. À notre connaissance, aucune autre équipe de recherche n'a procédé de cette façon auparavant. En effet, il n'est pas rare de constater l'utilisation de doses d'n-3 colossales dans les études comportementales chez le rongeur, de l'ordre de 400 à 4000 fois la dose utilisée dans notre étude[71,73,75,76]. De plus, le fait d'utiliser le gavage quotidien mimique davantage la supplémentation chez l'Humain que si les n-3 avaient été inclus directement dans la nourriture des souris, approche qui est très commune dans la littérature. Cette technique a le

désavantage d'être imprécise quant à la quantité d'n-3 ingérée par l'animal sans compter que la prise alimentaire peut en être affectée en raison, par exemple, de l'odeur désagréable qui se dégage de la nourriture, pouvant rebuter l'animal. Enfin, on ne peut passer sous silence le potentiel effet confondant de la composition du FO utilisé. En effet, cette huile contient 28% d'EPA et de DHA, ainsi que plusieurs autres acides gras tel l'acide palmitoléique, palmitique et myristique. Étant donné que cette formule n'est pas composée en totalité d'EPA et de DHA, il est important de garder en tête que les effets bénéfiques observés puissent être attribuables aux autres acides gras présents dans le FO ou à leur synergie entre eux. Néanmoins, considérant la vaste littérature au sujet des effets bénéfiques des n-3 EPA et DHA, nous émettons l'hypothèse qu'une grande partie des bénéfices peut leur être attribuée.

Nous avons également démontré un effet protecteur de la supplémentation en FO chez les souris HFD en ramenant leur tolérance au glucose au niveau des souris *chow*. Il aurait été toutefois pertinent de prélever, durant le test de tolérance au glucose, des échantillons sanguins afin de pouvoir doser l'insuline. Le dosage de l'insuline au sacrifice a effectivement démontré que les souris HFD possèdent une plus grande concentration de cette hormone en circulation. Les résultats du test de tolérance au glucose combinés à ceux des mesures protéiques de l'insuline nous indiquent que ces souris sont intolérantes au glucose. Il nous est toutefois impossible de différencier s'il s'agit d'une résistance ou d'un déficit de sécrétion d'insuline. Il est aussi difficile de déterminer par quel mécanisme se produit l'effet protecteur des n-3 chez les souris HFD. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une partie de ces effets pourraient être expliqués par l'implication de la voie des PPAR[64,65] ou encore par l'activation du

récepteur GPR120[110,121]. Néanmoins, nous pouvons conclure que cet effet protecteur n'est ni dû à une modification de la composition corporelle, mesurée par imagerie par résonance magnétique, ni à une modification de l'activité ambulatoire, du quotient respiratoire ou de la dépense énergétique mesurés grâce à des cages métaboliques. Tel qu'attendu, nous observons un effet significatif du HFD sur ces paramètres, mais aucune différence significative entre les types de supplémentation n'a été mise en évidence.

De façon cohérente, les trois tests de comportement utilisés dans cette étude ont démontré un effet délétère de la diète HFD, que ce soit par la réduction du temps passé dans les bras ouverts de l'EPM, l'immobilité augmentée dans le FST ou encore le nombre réduit d'entrées et de temps passé dans la zone claire du LDB. Nous avons aussi démontré qu'une supplémentation en FO empêche le déficit exploratoire des souris dans l'EPM induit par une HFD. Nous parlons ici de déficit exploratoire et non de déficit locomoteur puisqu'il n'y a pas de différence significative entre les groupes de supplémentation pour la vitesse dans le FST, démontrant que les animaux sont tout aussi capables de se mouvoir que les souris des autres groupes. Il n'en reste pas moins que l'importante réduction de la distance parcourue dans l'EPM pour les animaux HFD<sup>Ctrl</sup> comporte un effet confondant non négligeable lors de l'interprétation du test du LDB. En effet, étant donné que les souris HFD<sup>Ctrl</sup> explorent moins, ceux-ci seront donc moins portés à entrer et à rester dans la boîte claire. Ceci peut refléter un comportement de type anxieux, mais peut aussi en partie être expliqué par un déficit ambulatoire volontaire. Néanmoins, dans tous les résultats de comportement

présentés, les souris chow<sup>Ctrl</sup> ne présentent aucune différence significative avec les souris HFD<sup>F0</sup>, démontrant un fort effet protecteur des n-3 chez ces animaux.

En termes de lipidomique cérébrale, nous avons aussi mis en évidence une importante augmentation de l'EPA et de l'acide docosapentaénoïque (DPA), un intermédiaire entre la conversion de l'EPA vers le DHA[99], chez les animaux HFD<sup>F0</sup> comparativement aux souris HFD<sup>Ctrl</sup>. De façon intéressante, nous remarquons un effet marqué de la diète seulement pour l'acide dihomo-gamma-linolénique (DGLA), de même qu'un effet de la supplémentation seulement pour l'acide arachidonique (AA). Conformément à la littérature, nous avons mis en évidence que le DHA cérébral est stable suivant différentes interventions nutritionnelles, avec une absence de différence significative entre les groupes. Un résultat qui est similaire pour l'acide linoléique (LA). Considérant son utilisation fréquente dans les études cliniques pour évaluer l'apport à court terme en n-3[103], il aurait été intéressant de répéter le même exercice, mais cette fois dans les globules rouges, afin d'établir si des corrélations existent avec les concentrations cérébrales d'acides gras.

Finalement, nous avons démontré un effet protecteur des n-3 chez les souris HFD avec la réduction de paramètres associés à la gliose réactive cérébrale. Cette réduction est significative pour le marqueur microglial Iba1 et pratiquement pour le marqueur astrocytaire GFAP. L'induction de ces biomarqueurs suite à une inflammation engendrée par la diète est bien documentée dans la littérature. Ces mesures d'expression génique ont été effectuées sur des échantillons de cerveau entier. Il aurait été intéressant de mesurer ces mêmes marqueurs, mais au sein de régions cérébrales

impliquées dans les comportements anxio-dépressifs tels le NAc, le cortex préfrontal ou encore l'amygdale.

Dans l'article 2, nous avons voulu explorer davantage le mécanisme potentiel sous-tendant les effets observés dans l'article 1, soit l'implication du récepteur GPR120. Pour ce faire, nous avons choisi un agoniste spécifique et synthétique de ce récepteur, le cpdA. Nous avons procédé de cette façon afin de nous assurer que les effets observés sont secondaires à l'activation du récepteur, comparativement aux n-3 qui possèdent une multitude de cibles.

Nous avons d'abord montré la forte expression de ce récepteur dans les microglies primaires isolées à partir de cerveaux de souris. Nous avons également remarqué sa faible expression dans les autres types cellulaires ainsi que dans le cerveau entier. Ce dernier résultat est cohérent puisque la microglie constitue un très faible pourcentage de l'ensemble des types cellulaires du SNC[128]. L'expression microgliale de GPR120 a été confirmée de même que sa co-expression avec Iba1 dans la fraction positive pour la protéine jaune fluorescente (YFP; de l'anglais *yellow fluorescent protein*) exprimée par des souris adultes *CX3C chemokine receptor 1* (CX<sub>3</sub>CR1), marquant la microglie spécifiquement. Au sein de cette fraction YFP positive, nous remarquons l'absence des marqueurs astrocytaires (GFAP) et neuronaux (NeuN).

Nous avons aussi rapporté les différences morphologiques des microglies primaires *in vitro* suivant un traitement de LPS et d'agoniste de GPR120. La microglie prend une forme amiboïde et possède moins de ramifications lorsqu'elle est exposée au LPS seul, phénotype qui est prévenu par un prétraitement avec l'agoniste de GPR120. Cet effet anti-inflammatoire du cpdA a été confirmé par des mesures d'expression génique et de



sécrétion protéique de plusieurs cytokines pro-inflammatoires. En effet, le cpdA prévient l'escalade d'expression d'IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  et MCP-1 au sein de microglies primaires. Ceci est corrélé avec la prévention de l'augmentation de la sécrétion protéique d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ . Pour sa part, la sécrétion protéique d'IL-1 $\beta$  est inchangée après une exposition d'une heure de cpdA et de six heures de LPS. Cette observation est compatible avec les résultats d'étude démontrant le mécanisme de sécrétion d'IL-1 $\beta$  distinct d'IL-6 et TNF- $\alpha$ [129]. Nous émettons l'hypothèse que cette sécrétion est retardée par rapport aux cytokines utilisant un mécanisme de sécrétion conventionnel via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Malgré l'effet marqué du composé sur le profil inflammatoire des microglies, il est important de se questionner sur la méthodologie utilisée. En effet, à ce jour, les données disponibles ne permettent pas de déterminer avec certitude si la microglie présente dans le SNC est réellement exposée au LPS injecté en périphérie. Nous savons toutefois que les cytokines pro-inflammatoires peuvent diffuser à travers la BBB[130], le LPS restant, pour sa part, incertain. Il serait intéressant de répéter une méthodologie similaire en appliquant aux microglies un mélange de cytokines afin de vérifier si le phénotype observé est comparable.

Nous avons ensuite observé les effets du cpdA *in vivo* en conditions pro-inflammatoires. Nous avons infusé l'agoniste directement dans le cerveau des souris plutôt que de l'injecter en périphérie étant donné que nous ne connaissons pas la perméabilité de la BBB vis-à-vis du cpdA. Nous avons d'abord évalué l'expression de gènes d'intérêt dans le NAc. À notre grande surprise, Iba-1, IL-6 et IL-1 $\beta$  sont restés inchangés après l'administration du LPS, avec une tendance à la baisse avec le

prétraitement de cpdA pour IL-6 et IL-1 $\beta$ . Il existe dans la littérature une grande variabilité dans les délais utilisés par les équipes de recherche entre l'injection de LPS et le prélèvement des tissus. Nous avons déterminé au départ que les marqueurs inflammatoires étaient à leur apogée dans le cerveau deux heures post-injection[131]. À la lumière de nos résultats, nous émettons l'hypothèse que cette excursion surviendrait plus tard dans le temps. Il aurait été intéressant de mesurer ces mêmes marqueurs au même moment que les tests de comportement ont été effectués, soit 12h après l'injection de LPS. À l'origine, considérant les effets connus de la neuroinflammation sur les comportements de type anxio-dépressifs, nous avons sélectionné des tests dans cette optique, soit le EPM et le test du LDB. Étonnement, nous avons réalisé, en cours d'expérimentation, que les animaux injectés au LPS exprimaient davantage des comportements de maladie plutôt que de type anxio-dépressifs. Les comportements de maladie se définissent par un état d'inconfort généralisé caractérisé entre autres par de la fièvre, des capacités cognitives altérées de même qu'une diminution de l'appétit, de l'activité locomotrice et des interactions sociales[19]. De manière surprenante, l'agoniste de GPR120 a complètement prévenu la diminution de l'activité locomotrice induite par le LPS. Il aurait été intéressant d'utiliser des tests mesurant d'autres paramètres des comportements de maladie tels que la diminution d'interaction sociale, l'anhédonie et l'altération de capacités cognitives liées à la mémoire. Tout comme pour l'article 1, cette réduction importante de l'activité locomotrice constitue un effet confondant important dans l'interprétation des résultats d'anxiété du test du LDB. En revanche, il est intéressant de voir le parallèle à ce niveau entre les deux études présentées ici. Dans l'article 1, les n-3 ont

reversé le déficit exploratoire des souris suivant une inflammation induite par la diète. Dans l'article 2, un agoniste spécifique de GPR120 a prévenu la diminution de l'activité locomotrice induite par une inflammation d'origine bactérienne. Cette similitude suggère fortement l'implication du récepteur GPR120 dans les effets bénéfiques au niveau des comportements exploratoires observés dans l'article 1. Il n'en reste pas moins que le contexte inflammatoire utilisé dans l'article 2 diffère de celui résultant d'une obésité induite par la diète. Il aurait été intéressant, dans le cas de l'article 2, de répéter le même protocole, mais en utilisant des facteurs nutritionnels connus pour induire de l'inflammation, tel le palmitate. Les effets du cpdA à diminuer les effets nocifs d'une obésité induite par la diète restent encore mal compris et il serait pertinent dans le futur de les étudier davantage.

En somme, les résultats de ces deux articles améliorent nos connaissances actuelles sur les bienfaits des n-3 sur l'obésité et les complications associées. Ils ont également permis l'avancement des données récentes encore limitées du mécanisme de GPR120 dans les cellules microgliales et son effet protecteur sur la neuroinflammation. La suite pour ces deux projets de recherche serait d'utiliser une approche d'inactivation génétique de GPR120. En effet, pour confirmer que les effets protecteurs observés précédemment sont dépendants de GPR120, l'approche génétique est nécessaire. Pour la partie *in vitro*, l'utilisation de microglies primaires dont le gène de GPR120 est invalidé serait pertinente. De plus, nous pourrions appliquer un prétraitement avec le cpdA de même que différents acides gras n-3 pour en comparer les effets. Il serait intéressant d'induire un contexte pro-inflammatoire avec du palmitate, un acide gras qui serait plus représentatif de l'inflammation induite par la diète riche en gras saturés.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que les effets bénéfiques du cpdA et/ou des n-3 seraient complètement perdus au sein de microglie KO pour GPR120. Pour la partie *in vivo*, l'utilisation d'un KO de GPR120 serait également la prochaine étape à effectuer. Plusieurs équipes de recherches génèrent des modèles de *whole body KO*, qui invalident le gène d'intérêt à l'étape embryonnaire, et ce partout à travers l'organisme[132]. Cette approche a le désavantage de potentiellement altérer certaines fonctions développementales où le gène d'intérêt serait essentiel. Des processus adaptatifs et compensatoires pourraient alors subvenir dans l'organisme modifiant ainsi le fonctionnement normal. L'invalidation à l'âge adulte à l'aide d'un vecteur viral ou par tamoxifène par exemple permet d'éviter ce type de désagrément. C'est pourquoi l'induction d'un KO de GPR120 chez une souris adulte spécifiquement dans la microglie serait plus que pertinente dans ce cas-ci. Une exposition chronique à une diète HFD combinée à un gavage d'n-3 ou de cpdA pourrait être effectuée sur des souris sauvages ou KO pour GPR120 spécifiquement dans la microglie. Nous pourrions émettre l'hypothèse que les effets protecteurs autant métaboliques que comportementaux des n-3 et du cpdA seront perdus chez les souris GPR120 KO. L'activation de ce récepteur microglial par différents agonistes et son implication dans la régulation de la neuroinflammation et des modifications comportementales associées restent peu connues. Néanmoins, les n-3 de même que les cibles de GPR120 constituent une avenue prometteuse de recherche considérant leur potentiel thérapeutique chez l'Humain.

## Chapitre 5: Références

1. WHO World Health Organization.(2018). Obesity and overweight.
2. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC), Di Cesare M, Bentham J, et al.(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 (London, England)*, 387(10026), 1377-1396.
3. Association médicale canadienne.(2015). L'obésité au Canada: les causes, les conséquences et l'avenir. 2015.
4. Lebovitz HE, Banerji MA.(2005). Visceral Adiposity Is Causally Related to Insulin Resistance. *Diabetes*, 14(1), 2322-2325.
5. Ashwell M, Gunn P, Gibson S.(2012). Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: Systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*, 13(3), 275-286.
6. Egger G, Dixon J.(2014). Beyond obesity and lifestyle: A review of 21st century chronic disease determinants. *Biomed Res Int*, 2014.
7. Locke AE, Kahali B, Berndt SI, et al.(2015). Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*, 518(7538), 197-206.
8. Dixon JB.(2010). The effect of obesity on health outcomes. *Mol Cell Endocrinol*, 316(2), 104-108.
9. Canadian Mental Health Association. Depression and Bipolar Disorder.
10. American Psychiatric Association.(2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.*; 2013.

11. Pearson C, Janz T, Ali J. Mental and substance use disorders in Canada.
12. Gorman JM.(1996). Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. *Depress Anxiety*, 4(4), 160-168.
13. Pan A, Keum N, Okereke OI, et al.(2012). Bidirectional association between depression and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Diabetes Care*, 35(5), 1171-1180.
14. Bruce-Keller AJ, Keller JN, Morrison CD.(2009). Obesity and vulnerability of the CNS. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 1792(5), 395-400.
15. Mayeux R.(2012). Epidemiology of Alzheimer Disease. *Alzheimer DisAssocDisord*, 20(0893-0341 (Print)), S58-S62.
16. Luppino FS, De Wit LM, Bouvy PF, et al.(2015). Overweight, Obesity, and Depression: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. 67(3), 220-229.
17. Ouakinin SRS, Barreira DP, Gois CJ.(2018). Depression and Obesity: Integrating the Role of Stress, Neuroendocrine Dysfunction and Inflammatory Pathways. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9(July), 1-7.
18. Smith SM, Vale WW.(2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*, 8(4), 383-395.
19. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW.(2008). From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, 9(1), 46-56.
20. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP.(2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*, 139, 136-153.

21. Shechter R, Schwartz M.(2013). CNS sterile injury: Just another wound healing? *Trends Mol Med*, 19(3), 135-143.
22. Graeber MB, Li W, Rodriguez ML.(2011). Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett*, 585(23), 3798-3805.
23. Gendelman HE.(2002). Neural immunity: Friend or foe? *J Neurovirol*, 8(6), 474-479.
24. Aguilar-Valles A, Inoue W, Rummel C, Luheshi GN.(2015). Obesity, adipokines and neuroinflammation. *Neuropharmacology*, 96(PA), 124-134.
25. Vogel-Ciernia A, Wood MA.(2014). Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr Protoc Neurosci*, 2014(October), 8.31.1-8.31.17.
26. Heyward FD, Walton RG, Carle MS, Coleman MA, Garvey WT, Sweatt JD.(2012). Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression. *Neurobiol Learn Mem*, 98(1), 25-32.
27. Camer D, Yu Y, Szabo A, Fernandez F, Dinh CHL, Huang XF.(2015). Bardoxolone methyl prevents high-fat diet-induced alterations in prefrontal cortex signalling molecules involved in recognition memory. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*, 59, 68-75.
28. Jeon BT, Jeong EA, Shin HJ, et al.(2012). Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes*, 61(6), 1444-1454.
29. Sweis BM, Bachour SP, Brekke JA, et al.(2016). A modified beam-walking

- apparatus for assessment of anxiety in a rodent model of blast traumatic brain injury. *Behav Brain Res*, 296, 149-156.
30. Décarie-Spain L, Sharma S, Hryhorczuk C, et al.(2018). Nucleus accumbens inflammation mediates anxiodepressive behavior and compulsive sucrose seeking elicited by saturated dietary fat. *Mol Metab*, 10, 1-13.
  31. Biolabs C.(2019). Forced Swim Test. 2019.
  32. Almeida-Suhett CP, Graham A, Chen Y, Deuster P.(2017). Behavioral changes in male mice fed a high-fat diet are associated with IL-1 $\beta$  expression in specific brain regions. *Physiol Behav*, 169, 130-140.
  33. Das UN.(2006). Essential fatty acids: Biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol J*, 1(4), 420-439.
  34. R.A. R, R.J. D.(2007). Sources of the very-long-chain unsaturated omega-3 fatty acids: Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 10(2), 123-128.
  35. Alexander JW.(1998). Immunonutrition: the role of omega-3 fatty acids. *Nutrition*, 14(98), 627-633.
  36. De Caterina R.(2011). n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*, 364, 2439-2450.
  37. Burdge G.(2004). Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 7, 137-144.
  38. Burdge GC, Wootton SA.(2002). Conversion of  $\alpha$ -linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr*, 88(04), 411.



39. Diététistes du Canada.(2013). Sources alimentaires d'acides gras oméga-3. 2013.
40. Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada: Dietary Fatty Acids.(2007). *J Am Diet Assoc*, 107(9), 1599.e1-1599.e15.
41. Deckelbaum RJ, Torrejon C.(2012). The Omega-3 Fatty Acid Nutritional Landscape: Health Benefits and Sources. *J Nutr*, 142, 587-591.
42. Santé Canada.(2010). Apports nutritionnels de référence. 2010, 13.
43. Gouvernement du Canada.(2006). Tableaux des ANREF.
44. WHO.(2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 916, i-viii-1-149-backcover.
45. Arterburn L, Hall E, Oken H.(2006). Distribution, interconversion, and dose response of n- 3 fatty acids in humans. *Am J Cinical Nutr*, 83(6(S)), 1467S-1476S.
46. Hashimoto M, Hossain S, Shido O.(2006). Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid withstands dietary cholesterol-induced decreases in platelet membrane fluidity. *Mol Cell Biochem*, 293(1-2), 1-8.
47. Hirashima F, Parow AM, Stoll AL, et al.(2004). Omega-3 Fatty Acid Treatment and T 2 Whole Brain Relaxation Times in Bipolar Disorder. *Am J Psychiatry*, 161(10), 1922-1924.
48. Song C, Shieh CH, Wu YS, Kalueff A, Gaikwad S, Su KP.(2016). The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the treatment of major depression and Alzheimer's disease: Acting separately or synergistically? *Prog Lipid Res*, 62, 41-54.

49. Schmitz G, Ecker J.(2008). The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res*, 47(2), 147-155.
50. Meydani SN, Endres S, Woods MM, et al.(1991). Oral (n-3) Fatty Acid Supplementation Suppresses Cytokine Production and Lymphocyte Proliferation: Comparison Between Young and Older Women. *J Nutr*, 121(September 1990), 547-555.
51. Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, et al.(1989). The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med*, 1989.
52. Li K, Huang T, Zheng J, Wu K, Li D.(2014). Effect of marine-derived n-3 polyunsaturated fatty acids on C-reactive protein, interleukin 6 and tumor necrosis factor  $\alpha$ : A meta-analysis. *PLoS One*, 9(2), 1-28.
53. Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C.(2010). Fatty acids from fish: The anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr Rev*, 68(5), 280-289.
54. Swanson D, Block R, Mousa SA.(2012). Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Adv Nutr An ...*, 2012, 1-7.
55. Uauy R, Hoffman DR, Peirano P, Birch DG, Birch EE.(2001). Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids*, 36(9), 885-895.
56. Miles EA, Calder PC.(1998). Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Proc Nutr Soc*, 57(02), 277-292.
57. International Diabetes Federation.(2006). The IDF consensus worldwide

definition of the metabolic syndrome. 2006.

58. Sinclair HM.(1953). The Diet of Canadian Indians and Eskimos. *Proc Nutr Soc*, 12(01), 69-82.
59. Bang HO, Dyerberg J, Hjörne N.(1976). The Composition of Food Consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med Scand*, 200(1-6), 69-73.
60. Saito Y, Yokoyama M, Origasa H, et al.(2008). Effects of EPA on coronary artery disease in hypercholesterolemic patients with multiple risk factors: Sub-analysis of primary prevention cases from the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). *Atherosclerosis*, 200(1), 135-140.
61. Tierney AC, McMonagle J, Shaw DI, et al.(2011). Effects of dietary fat modification on insulin sensitivity and on other risk factors of the metabolic syndrome-LIPGENE: A European randomized dietary intervention study. *Int J Obes*, 35(6), 800-809.
62. Brady LM, Williams CM, Lovegrove JA.(2004). Dietary PUFA and the metabolic syndrome in Indian Asians living in the UK. *Proc Nutr Soc*, 63(01), 115-125.
63. Lopez-Huertas E.(2012). The effect of EPA and DHA on metabolic syndrome patients: A systematic review of randomised controlled trials. *Br J Nutr*, 107(SUPPL. 2).
64. Martinez-Fernandez L, Laiglesia LM, Huerta AE, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ.(2015). Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 121, 1-18.
65. Belchior T, Paschoal VA, Magdalon J, et al.(2015). Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation

- through PPAR $\gamma$ -dependent and PPAR $\gamma$ -independent actions. *Mol Nutr Food Res*, 59(5), 957-967.
66. Belzung C, Leguisquet AM, Barreau S, Delion-Vancassel S, Chalon S, Durand G.(1998). Alpha-linolenic acid deficiency modifies distractibility but not anxiety and locomotion in rats during aging. *J Nutr*, 128(9), 1537-1542.
  67. Frances H, Monier C, Bourre J-M.(1995). EFFECTS OF DIETARY ALPHA-LINOLENIC ACID DEFICIENCY ON NEUROMUSCULAR AND COGNITIVE FUNCTIONS IN MICE. *Life Sci*, 575(7).
  68. Hascoët M, Bourin M.(2009). The mouse light-dark box test. *Neuromethods*, 2009.
  69. Stoelting.(2019). Light/dark box. 2019.
  70. Carrié I, Clément M, De Javel D, Francès H, Bourre J-M.(2000). Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *J Lipid Res*, 41.
  71. Takeuchi T, Iwanaga M, Harada E.(2003). Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. *Brain Res*, 964, 136-143.
  72. Harauma A, Moriguchi T.(2011). Dietary n-3 Fatty Acid Deficiency in Mice Enhances Anxiety Induced by Chronic Mild Stress. 2011.
  73. Reddy Venna V, Deplanque D, Allet C, Belarbi K, Hamdane M, Bordet R. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus.
  74. Huang SY, Yang HT, Chiu CC, Pariante CM, Su KP.(2008). Omega-3 fatty acids on the forced-swimming test. *J Psychiatr Res*, 42(1), 58-63.

75. Lakhwani L, Tongia SK, Pal VS, Agrawal RP, Nyati P, Phadnis P.(2007). Omega-3 fatty acids have antidepressant activity in forced swimming test in Wistar rats. *Acta Pol Pharm*, 64(3), 271-276.
76. Ferraz AC, Kiss Á, Araújo RLF, et al.(2008). The antidepressant role of dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids in two phases in the developing brain. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*, 78(3), 183-188.
77. Commons KG, Cholanians AB, Babb JA, Ehlinger DG.(2017). The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chem Neurosci*, 8(5), 955-960.
78. Anyan J, Amir S.(2018). Too Depressed to Swim or Too Afraid to Stop? A Reinterpretation of the Forced Swim Test as a Measure of Anxiety-Like Behavior. *Neuropsychopharmacology*, 43(5), 931-933.
79. Van De Rest O, Geleijnse JM, Kok FJ, et al.(2008). Effect of fish-oil supplementation on mental well-being in older subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 88, 706-713.
80. Woo J, Couturier J, Pindiprolu B, et al.(2017). Acceptability and tolerability of omega-3 fatty acids as adjunctive treatment for children and adolescents with eating disorders. *Eat Disord*, 2017.
81. Cohen LS, Joffe H, Guthrie KA, et al.(2013). Efficacy of omega-3 for vasomotor symptoms treatment: a randomized controlled trial. 21(4), 347-354.
82. Sohrabi N, Kashanian M, Ghafoori SS, Malakouti SK.(2013). Evaluation of the effect of omega-3 fatty acids in the treatment of premenstrual syndrome: “ A pilot trial.” *Complement Ther Med*, 2013.

83. Barbadoro P, Annino I, Ponzio E, et al.(2013). Fish oil supplementation reduces cortisol basal levels and perceived stress: A randomized, placebo-controlled trial in abstinent alcoholics. *Mol Nutr Food Res*, 2013.
84. Buydens-Branchey L, Branchey M, Hibbeln JR.(2008). Associations between increases in plasma n-3 polyunsaturated fatty acids following supplementation and decreases in anger and anxiety in substance abusers. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*, 2008.
85. Kiecolt-Glaser JK, Belury MA, Andridge R, Malarkey WB, Glaser R.(2011). Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: A randomized controlled trial. *Brain Behav Immun*, 2011.
86. Grosso G, Pajak A, Marventano S, et al.(2014). Role of omega-3 fatty acids in the treatment of depressive disorders: A comprehensive meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS One*, 9(5).
87. Institute of Medicine Committee on Dietary Risk Assessment in the WIC Program.(2002). 5, Food-Based Assessment of Dietary Intake. Dietary Risk Assessment in the WIC Program.
88. El-den S, Chen TF, Gan Y, Wong E, Reilly CLO.(2018). The psychometric properties of depression screening tools in primary healthcare settings: A systematic review. *J Affect Disord*, 225(June 2017), 503-522.
89. Cicero AFG, Morbini M, Borghi C.(2015). Do we need ' new ' omega-3 polyunsaturated fatty acids formulations ? 6566.
90. Mohrhauer H. and Holman R.T.(1963). Alteration of the fatty acid composition of brain lipids by varying levels of dietary essential fatty acids. *J Neurochem*, 10,

523-530.

91. Bourre JM, Pascal G, Durand G, Masson M, Dumont O, Piciotti M.(1984). Alterations in the Fatty Acid Composition of Rat Brain Cells (Neurons, Astrocytes, and Oligodendrocytes) and of Subcellular Fractions (Myelin and Synaptosomes) Induced by a Diet Devoid of n-3 Fatty Acids. *J Neurochem*, 43(2), 342-348.
92. Bourre J-M, Francois M, Youyou A, et al.(1989). Effects of dietary alpha linolenic acid on nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poison and performance of learning tasks in rats. (November 1987), 1880-1892.
93. Bourre J-M, Däoemomt O, Pascal G, Durand G.(1993). Dietary a-Linolenic Acid at 1.3 g/kg Maintains Maximal Docosahexaenoic Acid Concentration in Brain, Heart and Liver of Adult Rats<sup>1</sup>. *J Nutr*, 123, 1313-1319.
94. Alessandri J-M, Guesnet P, Delion-Vancassel S, et al.(2004). Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev*, 44, 509-538.
95. Calder PC.(2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *J Parenter Enter Nutr*, 39, 18S-32S.
96. Chen CT, Liu Z, Ouellet M, Calon F, Bazinet RP.(2009). Rapid  $\beta$ -oxidation of eicosapentaenoic acid in mouse brain: An in situ study. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*, 80(2-3), 157-163.
97. Dyall SC.(2015). Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front Aging Neurosci*, 7(APR), 1-15.

98. Rapoport SI, Ramadan E, Basselin M.(2011). Docosahexaenoic Acid (DHA) Incorporation into the Brain from plasma, as an in vivo biomarker of brain DHA metabolism and neurotransmission. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2011.
99. Calder PC.(2016). Docosahexaenoic acid. *Ann Nutr Metab*, 69(1), 8-21.
100. Calder PC.(2018). Very long-chain n-3 fatty acids and human health: Fact, fiction and the future. *Proc Nutr Soc*, 77(1), 52-72.
101. Edwards R.(1998). Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients. *J Affect Disord*, 48(2-3), 149-155.
102. Huan M, Hamazaki K, Sun Y, et al.(2004). Suicide attempt and n-3 fatty acid levels in red blood cells: A case control study in China. *Biol Psychiatry*, 56(7), 490-496.
103. Serra-Majem L, Nissensohn M, Øverby NC, Fekete K.(2012). Dietary methods and biomarkers of omega 3 fatty acids: A systematic review. *Br J Nutr*, 107(SUPPL. 2).
104. McNamara RK, Jandacek R, Rider T, et al.(2009). Fatty acid composition of the postmortem prefrontal cortex of adolescent male and female suicide victims. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*, 80(1), 19-26.
105. Hamazaki K, Maekawa M, Toyota T, Dean B, Hamazaki T, Yoshikawa T.(2015). Fatty acid composition of the postmortem prefrontal cortex of patients with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Psychiatry Res*, 227(2-3), 353-359.
106. Lalovic A, Levy É, Canetti L, Sequeira A, Montoudis A, Turecki G.(2007). Fatty



- acid composition in postmortem brains of people who completed suicide. *J Psychiatry Neurosci*, 32(5), 363-370.
107. Talukdar S, Olefsky JM, Osborn O.(2011). Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 32(9), 543-550.
108. Cheng Z, Garvin D, Paguio A, Stecha P, Wood K, Fan F.(2010). Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways. *Curr Chem Genomics*, 4, 84-91.
109. Fredriksson R, Höglund PJ, Gloriam DEI, Lagerström MC, Schiöth HB.(2003). Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett*, 554(3), 381-388.
110. Zhang D, Leung PS.(2014). Potential roles of GPR120 and its agonists in the management of diabetes. *Drug Des Devel Ther*, 8, 1013-1027.
111. Hu GM, Mai TL, Chen CM.(2017). Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution. *Sci Rep*, 7(1), 1-15.
112. Moniri NH.(2016). Free-fatty acid receptor-4 (GPR120): Cellular and molecular function and its role in metabolic disorders. 2016.
113. Ichimura A, Hirasawa A, Hara T, Tsujimoto G.(2009). Free fatty acid receptors act as nutrient sensors to regulate energy homeostasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 89(3-4), 82-88.
114. Ichimura A, Hara T, Hirasawa A.(2014). Regulation of energy homeostasis via GPR120. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014.
115. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, et al.(2010). GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid

- Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell*, 2010.
116. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, et al.(2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*, 2005.
  117. Milligan G, Alvarez-Curto E, Hudson BD, Prihandoko R, Tobin AB.(2017). FFA4/GPR120: Pharmacology and Therapeutic Opportunities. *Trends Pharmacol Sci*, 38(9), 809-821.
  118. Zhang D.(2014). Potential roles of GPR120 and its agonists in the management of diabetes. 2014, 1013-1027.
  119. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, et al.(2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*, 11(1), 90-94.
  120. Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, et al.(2012). Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature*, 483.
  121. Oh DY, Walenta E, Akiyama TE, et al.(2014). A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat Med*, 2014.
  122. Pærregaard SI, Agerholm M, Serup AK, et al.(2016). FFAR4 (GPR120) Signaling Is Not Required for Anti-Inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects of Omega-3 Fatty Acids. *Mediators Inflamm*, 2016, 1536047.
  123. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, et al.(2012). Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One*, 7(1).
  124. Auguste S, Fiset A, Fernandes MF, et al.(2016). Central Agonism of GPR120

- Acutely Inhibits Food Intake and Food Reward and Chronically Suppresses Anxiety-Like Behavior in Mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, 19(7), 1-10.
125. Dantzer R. Cytokine-Induced Sickness Behavior: Mechanisms and Implications.
  126. Huang S, Rutkowsky JM, Snodgrass RG, et al.(2012). Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res*, 53(9), 2002-2013.
  127. Nair A, Jacob S.(2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm*, 7(2), 27.
  128. Pelvig DP, Pakkenberg H, Stark AK, Pakkenberg B.(2008). Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol Aging*, 29(11), 1754-1762.
  129. Lopez-Castejon G, Brough D.(2011). Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*, 22(4), 189-195.
  130. Banks WA.(2009). Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol*, 9(SUPPL. 1), 5-9.
  131. André C, Dinel AL, Ferreira G, Layé S, Castanon N.(2014). Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: Focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation. *Brain Behav Immun*, 2014.
  132. Jiang X-C.(2013). Generation of General and Tissue-Specific Gene Knockout Mouse Models. In: Freeman LA, ed. *Lipoproteins and Cardiovascular Disease: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013:253-271.