



**Impact de l'apport alimentaire en AGPI n-3 sur le  
métabolisme énergétique cérébral : approches in vivo  
chez le rat en situation de repos ou d'activation  
neuronale et in vitro sur un modèle d'astrocytes en  
culture primaire**

Emilie Harbeby

► **To cite this version:**

Emilie Harbeby. Impact de l'apport alimentaire en AGPI n-3 sur le métabolisme énergétique cérébral : approches in vivo chez le rat en situation de repos ou d'activation neuronale et in vitro sur un modèle d'astrocytes en culture primaire. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112160 . tel-00653444

**HAL Id: tel-00653444**

**<https://theses.hal.science/tel-00653444>**

Submitted on 19 Dec 2011

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

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

UNIVERSITE PARIS SUD XI - UFR DES SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES-AgroParisTech

Thèse présentée pour obtenir le grade de

Docteur en Sciences

De l'université de PARIS XI

Par

Emilie HARBEY

IMPACT DE L'APPORT ALIMENTAIRE EN AGPI n-3 SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL :

APPROCHES *IN VIVO* CHEZ LE RAT EN SITUATION DE REPOS OU D'ACTIVATION NEURONALE ET

*IN VITRO* SUR UN MODELE D'ASTROCYTES EN CULTURE PRIMAIRE

Directeur de Thèse : M. GUESNET Philippe

Soutenue le 26 Septembre 2011 devant le jury :

M. Mohammed TAOUIS	Président
M. Philippe BESNARD	Rapporteur
M. Jean-Charles MARTIN	Rapporteur
Mme Bernadette DELPLANQUE	Examineur
M. Stephen CUNNANE	Examineur
M. Philippe GUESNET	Examineur

Cofinancement INRA-LESIEUR



## ABREVIATIONS

2-DG : 2-déoxy-Glucose  
AA : Acide Arachidonique (20:4n-6)  
Ach : Acétylcholine  
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (actuellement ANSES, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail)  
AG : Acide Gras  
AGMI : Acide Gras Monoinsaturé  
AGPI : Acide Gras Polyinsaturé  
AGS : Acide Gras Saturé  
AGT : Acides gras totaux  
ALA : Acide  $\alpha$ -Linoléique (18:3n-3)  
ANC : Apports Nutritionnels Conseillés  
BACE1 :  $\beta$ -sécrétase 1  
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor  
BHE : Barrière Hémato Encéphalique  
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse  
Ct : Cycle Threshold (cycle seuil)  
DGLA : Acide dihomog- $\gamma$ -linoléique (20:3n-6)  
DHA : Acide Docosahexaénoïque (22:6n-3)  
DMA : DiMéthyl Acétals  
DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age  
DPA n-6 ou n-3 : Acide Docosapentaénoïque de la série n-6 (22:5n-6) ou de la série n-3 (22:5n-3)  
dpm : Désintégration par minute  
DO : Densité Optique  
DTA : Acide docosatétranoïque ou adrénique (22:4n-6)  
DTT : Dithiotréitol  
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique  
EPA : Acide Eicosapentaénoïque (20:5 n-3)  
pFABPpm : placental plasma membrane Fatty Acid Binding Protein  
FAT : Fatty Acid Transporter  
FATP : Fatty Acid Transport Protein  
FDG : Fluoro-2-déoxy-Glucose  
GLUT : Glucose Transporter  
GPE : GlycéroPhospholipides à Ethanolamine  
HNF4 : Hepatic Nuclear Factor 4  
HRP : Horse Radish Peroxydase  
5-HT : Sérotonine  
IL : Interleukine  
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique  
LA : Acide Linoléique (18:2 n-6)  
LT : Leucotriènes  
LXR : Liver X Receptor  
MCT : Monocarboxylate Transporter  
MEM : Milieu Essentiel Minimum de Eagle  
NPD1 : Neuroprotectine D1  
PBST : Phosphate Buffered Saline with Triton  
PC : PhosphatidylCholine  
PE : Formes diacyles des glycérophospholipides à éthanolamine  
PGE2 : Prostaglandine E2

PGI2 : Prostacycline I2  
 PLA2 : Phospholipase A2  
 PPAR : récepteur au proliférateur de peroxyosome  
 PS : Phosphatidylsérine  
 RIN : RNA Integrity Number  
 RIPA : RadioImmunoPrecipitation Assay  
 ROI : Regions Of Interest (Régions d'intérêt)  
 RXR : Retinoid X Receptor  
 SB : Sample Buffer  
 SDS : Sodium Dodecyl Sulfate  
 SGLT : Sodium-Glucose Linked Transporter  
 SNC : Système Nerveux Central  
 SREBP-1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c  
 SUV : Standardized Uptake Value  
 SVF : Sérum de Veau Foetal  
 TEP : Tomographie par Emission de Positons  
 TLDA : TaqMan® Low Density Arrays  
 TNF : Tumor Necrosis Factor  
 THA : Acide tétracosahexaénoïque (24:6n-3)  
 TPA n-6 ou n-3 : Acide tétracosapentaénoïque de la série n-6 (24:5n-6) ou de la série n-3 (24:5n-3)  
 TTA : Acide tétracosatétraénoïque (24:4n-6)  
 TXA2 : Thromboxane A2

### Protéines dont l'expression génique a été étudiée

Abréviation	Nom du gène
GLUT1	Glucose transporter-1
GLUT3	Glucose transporter-3
HK1	Hexokinase 1
GPI	Glucose phosphate isomerase
PFK-M	Phosphofructokinase (muscle type)
PFK-P	Phosphofructokinase (platelet type)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
ENO1	Enolase 1 (alpha)
ENO2	Enolase 2
PK-LR	Pyruvate kinase (liver type)
PK-M2	Pyruvate kinase (muscle type)
GSK3a	Glycogen synthase kinase 3 alpha
GSK3b	Glycogen synthase kinase 3 beta

LDH1	Lactate dehydrogenase 1
LDH5	Lactate dehydrogenase 5
MCT1	Monocarboxylate transporter-1
MCT2	Monocarboxylate transporter-2
MCT4	Monocarboxylate transporter-4
GLs	Glutaminase
Glul	Glutamine synthetase
GLT1	Glial-specific glutamate transporter-1
GLAST	Glutamate-aspartate transporter
ATP1a2	Alpha 2 subunit
ATP1a3	Alpha 3 subunit
PDHa1	Pyruvate dehydrogenase alpha 1
PDHb	Pyruvate dehydrogenase beta
CS	Citrate synthase
IDH3g	Isocitrate dehydrogenase 3 gamma,
MDH1	Malate dehydrogenase 1
MDH2	Malate dehydrogenase 2
ME1	Malic enzyme 1
Ndufa5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 5
SDHa	Succinate dehydrogenase complex subunit A
Uqcrc1	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I
Uqcrc2	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II
COX6c	Cytochrome c oxidase subunit VIc
COX8a	Cytochrome c oxidase subunit VIIa
ATP5g1	ATP synthase F0 complex subunit C1
ATP5h	ATP synthase F0 complex subunit d
ATP5j	ATP synthase F0 complex subunit F6
ATP5d	ATP synthase F1 complex subunit delta
ATP5b	ATP synthase F1 complex subunit beta polypeptide
ATP5o	ATP synthase F1 complex subunit O

---

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

### FIGURES.

**Figure 1** : Structure et nomenclature des différentes familles d'acides gras

**Figure 2** : Mode d'action des enzymes  $\Delta 12$ - et  $\Delta 15$ -désaturases

**Figure 3** : Voies de biosynthèse des acides gras polyinsaturés (AGPI) n-6 et n-3 à longue chaîne à partir des AGPI précurseurs indispensables

**Figure 4** : Taux de conversion de l'acide alpha-linolénique en dérivés n-3 supérieurs (EPA et DHA) chez l'homme adulte omnivore en bonne santé estimé au moyen d'isotopes stables

**Figure 5** : Métabolisation des AGPI par les voies des cyclooxygénases (conduisant à la formation des prostanoides) et de la lipoxygénase (conduisant à la formation des leucotriènes)

**Figure 6** : Effets des PPAR $\gamma$  sur la formation des plaques amyloïdiennes

**Figure 7** : Modèle de captage et de synthèse des AGPI longues chaînes dans le cerveau à partir des AGPI présents dans la circulation sanguine

**Figure 8** : Quantité de DHA accumulée au cours des 6 premiers de vie dans l'organisme du nourrisson allaité au sein ou avec une formule commerciale basique

**Figure 9** : Principales voies de l'utilisation des substrats énergétiques par le cerveau

**Figure 10** : La glycolyse-Etapes, enzymes, cofacteurs

**Figure 11** : Les différentes étapes du Cycle de Krebs

**Figure 12** : Les complexes de la voie de phosphorylation oxydative (chaîne respiratoire)

**Figure 13** : Répartition de la consommation d'énergie lors d'une activation neuronale

**Figure 14** : Couplage neuro-métabolique, modèle "Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle"

**Figure 15** : Localisation des zones cérébrales de notre étude (cortex fronto-pariétal et hippocampe) chez le rat-Coupe de l'hippocampe

**Figure 16** : Immunohistochimie cFos

**Figure 17** : Analyse de la composition et de la teneur en acides gras des classes de phospholipides des membranes cérébrales

**Figure 18** : Taqman Low Density Arrays ou cartes microfluidiques

**Figure 19** : Principe du Western Blot

**Figure 20** : Processus d'annihilation

**Figure 21** : Quantification relative de l'utilisation cérébrale du glucose (2-déoxyglucose marqué au Fluor-18) dans les zones cérébrales d'intérêt (ROI)

**Figure 22** : Protocoles expérimentaux de mesure de l'utilisation cérébrale de glucose par imagerie TEP

**Figure 23** : Observation par microscopie optique de l'évolution du tapis cellulaire au cours de la culture d'astrocytes (x200)

**Figure 24** : Principe de marquage spécifique des protéines membranaires par la technique de biotinylation

**Figure 25** : Transformation du lactate en pyruvate par la lactate déshydrogénase

**Figure 26** : Proportion des 3 principales classes de phospholipides dans le cortex et l'hippocampe en fonction des 3 régimes expérimentaux

**Figure 27** : Composition en AA, DPA n-6 et DHA des 3 classes de phospholipides (PC, GPE et PS) dans le cortex des rats recevant un régime équilibré en AGPI n-6/n-3, déficient en n-3 ou supplémenté en DHA

**Figure 28** : Composition en AA, DPA n-6 et DHA des 3 classes de phospholipides (PC, GPE et PS) dans l'hippocampe des rats recevant un régime équilibré en AGPI n-6/n-3, déficient en n-3 ou supplémenté en DHA

**Figure 29** : Comparaison des teneurs en DHA et AA dans le cortex et l'hippocampe chez les animaux recevant un régime équilibré

**Figure 30** : Comparaison des variations de teneur en DHA et en AA dans le cortex et l'hippocampe chez les rats déficients ou supplémentés

**Figure 31** : Composition en AA, DPA n-6 et DHA des 2 classes phospholipides PC et GPE du foie chez des rats ayant reçu un régime équilibré en AGPI n-6/n-3, un régime déficient en AGPI n-3 et un régime supplémenté en DHA

**Figure 32** : Composition en AA, DPA n-6 et DHA de la PS du plasma chez des rats ayant reçu un régime équilibré en AGPI n-6/n-3, un régime déficient en AGPI n-3 et un régime supplémenté en DHA

**Figure 33** : Effet d'une activation neuronale pour les rats des 3 régimes expérimentaux sur l'expression de GLUT1 au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe

**Figure 34** : Effet d'un apport alimentaire en AGPI n-3 et d'une activation sur l'expression protéique des transporteurs GLUT1 et MCT2 au niveau du cortex fronto-pariétal

**Figure 35** : Effet d'une déficience en AGPI n-3 sur l'utilisation du  $^{18}\text{F}$ FDG chez des animaux en situation d'activation

**Figure 36** : Effet d'une déficience en AGPI n-3 sur l'utilisation du  $^{18}\text{F}$ FDG chez des animaux en situation basale sur 45 minutes

**Figure 37** : Effet de la déficience alimentaire en AGPI n-3 sur les paramètres de cinétique d'utilisation du  $^{18}\text{F}$ FDG chez l'animal au repos

**Figure 38** : Variation d'expression des gènes du métabolisme énergétique chez les rats recevant un régime déficient en AGPI n-3 dans le cortex fronto-pariétal

**Figure 39** : Variation d'expression des gènes du métabolisme énergétique chez les rats recevant un régime supplémenté en AGPI n-3 dans le cortex fronto-pariétal

**Figure 40** : Variation d'expression des gènes du métabolisme énergétique chez les rats recevant un régime déficient en AGPI n-3 dans la couche CA1 de l'hippocampe

**Figure 41** : Variation d'expression des gènes du métabolisme énergétique chez les rats recevant un régime supplémenté en AGPI n-3 dans la couche CA1 de l'hippocampe

**Figure 42** : Evolution du métabolisme du glucose au cours de la culture d'astrocytes de J6 à J21

**Figure 43** : Evolution du métabolisme du lactate au cours de la culture d'astrocytes de J6 à J21

**Figure 44** : Effets des AGPI (à court et long terme) sur le métabolisme du glucose d'astrocytes à 21 jours de culture

**Figure 45** : Effets des AGPI (à court et long terme) sur le métabolisme du lactate d'astrocytes à 21 jours de culture

**Figure 46** : Effets du glutamate sur les paramètres du métabolisme énergétique astrocytaire

**Figure 47** : Effets des AGPI et de l'ajout de glutamate (200 $\mu\text{M}$  finale) sur l'utilisation du glucose, l'activité de la LDH 5, la libération de lactate et l'expression de MCT1



## **TABLEAUX.**

**Tableau 1 :** Apports Nutritionnels Conseillés (ANC) (en% de l'apport énergétique) pour un adulte consommant 2000kcal/jour

**Tableau 2 :** Teneur en acides gras polyinsaturés des phospholipides totaux dans les différents types cellulaires cérébraux

**Tableau 3 :** ANC en acides gras polyinsaturés précurseurs et longues chaînes en fonction de l'âge

**Tableau 4 :** Composition en macronutriments des régimes expérimentaux

**Tableau 5 :** Composition et teneur en acides gras des régimes expérimentaux

**Tableau 6 :** Composition en acides gras des huiles expérimentales

**Tableau 7 :** Composition des solvants d'élution utilisés pour la séparation des principales classes de phospholipides sur cartouches aminopropylées

**Tableau 8 :** Numéro d'accèsion et fonction principale des 44 gènes étudiés du métabolisme énergétique cérébral

**Tableau 9 :** Concentration des 3 classes majeures de phospholipides

**Tableau 10 :** Comparaison du niveau d'expression des gènes du métabolisme énergétique cérébral entre les cortex fronto-pariétal et la couche CA1 de l'hippocampe chez les animaux équilibrés

**Tableau 11 :** Effet d'une déficience en AGPI n-3 ou d'une supplémentation en AGPI n-3 longue chaîne sur l'expression des gènes du métabolisme énergétique dans le cortex fronto-pariétal

**Tableau 12 :** Effet d'une déficience en AGPI n-3 ou d'une supplémentation en AGPI n-3 longue chaîne sur l'expression des gènes du métabolisme énergétique dans la couche CA1 de l'hippocampe

**Tableau 13 :** Effet d'une activation neuronale pour les 3 régimes expérimentaux sur l'expression des gènes du métabolisme énergétique au niveau du cortex fronto-pariétal

**Tableau 14 :** Comparaison des compositions lipidiques du cortex, de l'hippocampe, du foie et du plasma d'animaux recevant un régime équilibré en AGPI n-6/n-3 ou déficient en AGPI n-3

**Tableau 15 :** Effet de la déficience alimentaire en AGPI n-3 sur les paramètres de cinétique d'utilisation du <sup>18</sup>FDG chez l'animal au repos

Si tous les acides gras alimentaires présentent une fonction à la fois énergétique et structurale comme constituants des lipides membranaires, seuls certains d'entre eux exercent un rôle plus spécifique de nutriment essentiel comparable à celui des vitamines. Ce sont les acides gras dits indispensables qui regroupent les 2 familles d'acides gras polyinsaturés (AGPI) n-6 et n-3.

La compréhension du rôle fondamental des AGPI n-6 dans nombre de processus physiologiques, et plus particulièrement celui de l'acide linoléique (18:2n-6) s'est progressivement étendue à partir de données obtenues chez des animaux dans les années 30, puis d'observations cliniques faites dans les décennies suivantes. Les premières observations faites chez l'Homme datent des années 1970, notamment lorsque Soderhjelm *et al.* (1970) démontrèrent qu'un apport alimentaire en acide linoléique corrigeait les symptômes de dermatose chez des enfants qui avaient été nourris avec des régimes totalement dépourvus de lipides.

L'indispensabilité des AGPI n-3 a été mise en évidence plus tardivement, dans les années 80. Un certain nombre d'études conduites entre 1975 et 1990 chez des rongeurs ou des primates non-humains ont montré qu'une déficience alimentaire en n-3 provoquait des perturbations des fonctions visuelle et cognitive. L'essentialité des AGPI de la famille n-3 chez l'Homme et de son précurseur indispensable l'acide  $\alpha$ -linolénique (18:3n-3) a été clairement démontrée au début des années 80 avec les travaux d'Holman *et al.* (1982). Suite à un accident, une fillette de 6 ans maintenue sous nutrition parentérale totale avec une solution riche en acide linoléique, mais faible en acide  $\alpha$ -linolénique, avait développé des troubles neurologiques. La correction de ces symptômes par une alimentation riche en AGPI n-3 apporta la première démonstration de l'importance des AGPI n-3 pour le système nerveux central (SNC).

Ainsi, de par leur nature et leur abondance dans l'alimentation, les AGPI sont susceptibles d'influer sur la prévention ou la survenue d'un grand nombre de pathologies (Astorg *et al.*, 2006 ; Calder et Yaqoob, 2009). Or, dans un grand nombre de pays industrialisés il existe un net déséquilibre de l'apport alimentaire en AGPI n-6 et n-3. Ainsi en France, la faible consommation d'acide  $\alpha$ -linolénique (qui représente en moyenne la moitié de l'apport recommandé) se traduit par une valeur élevée du rapport acide linoléique/acide  $\alpha$ -linolénique, laquelle est supérieure à 11, ce qui correspond au double de la valeur recommandée par l'AFSSA (2010). Ce déséquilibre s'est installé progressivement depuis les

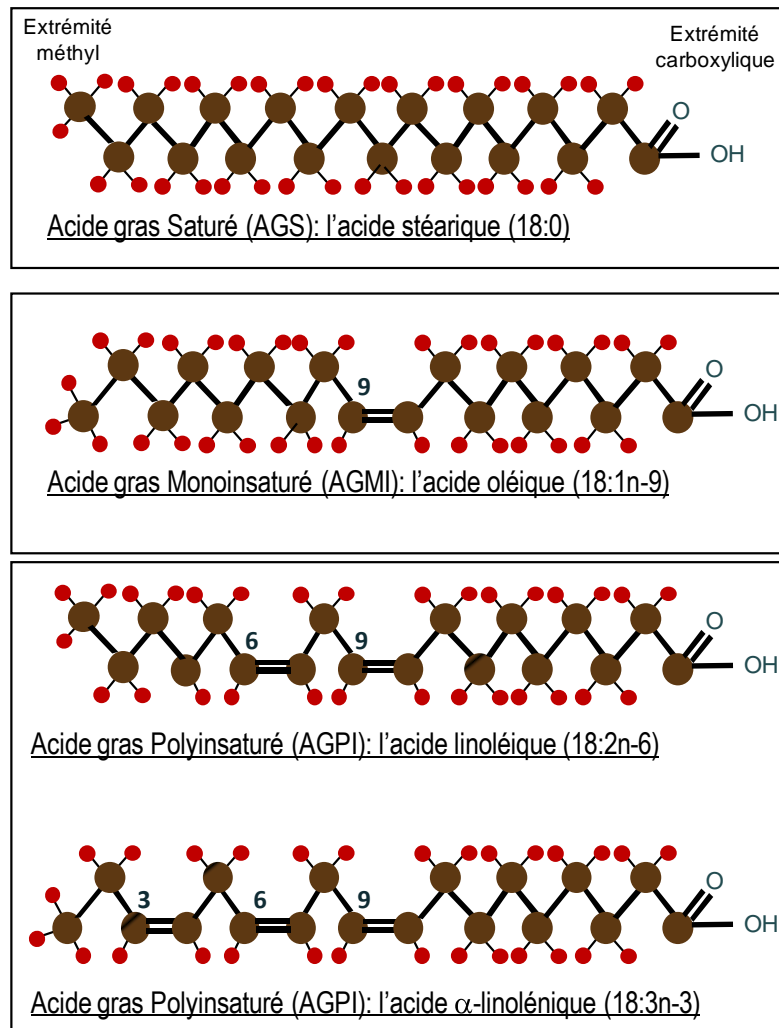
années 60, en raison de l'introduction croissante de produits alimentaires enrichis en acide linoléique, et pourrait ainsi avoir contribué à l'augmentation d'un grand nombre de pathologies, en particulier celles qui se sont étendues dans les pays développés au cours des dernières décennies : inflammation, accidents cardiovasculaires, diabète de type 2, syndrome métabolique et obésité (Simopoulos, 2002, 2010 ; Ailhaud *et al.*, 2008).

L'impact du déséquilibre n-6/n-3 sur les fonctions cérébrales a été mis en évidence dans un certain nombre de travaux, menés notamment au laboratoire, par l'étude des relations entre les AGPI n-3 et l'activité neuronale. Ces différents travaux ont notamment montré que les AGPI n-3 modulent le métabolisme énergétique à plusieurs niveaux : le transport du glucose (Pifferi *et al.*, 2005 ; Hichami *et al.*, 2007), la glycolyse (Kothapalli *et al.*, 2007), la phosphorylation oxydative (Ximenes *et al.*, 2002 ; Kitajka *et al.*, 2002, Barcelo-Coblijn *et al.*, 2003 ; Kitajka *et al.*, 2004) et l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Bersohn et Spitz, 1974 ; Bourre *et al.*, 1989). Pour approfondir ces recherches nous avons notamment suivi au cours de ce travail de thèse 2 approches expérimentales conduites *in vivo* et *in vitro* :

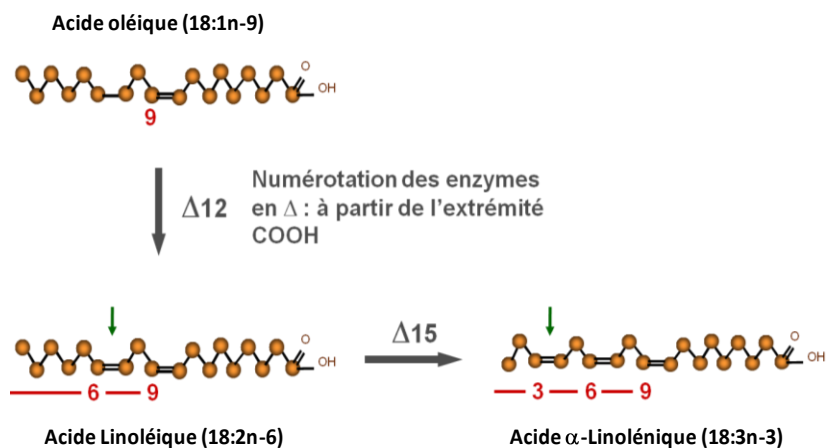
- 1) Chez des rats recevant 3 régimes alimentaires différents en terme d'apport en n-3, nous nous sommes intéressés à cerner les différentes étapes du métabolisme énergétique cérébral pouvant être modulés : consommation de glucose, glycolyse, activité mitochondriale (cycle de Krebs et phosphorylation oxydative) en comparant les réponses chez l'animal au repos ou en situation d'activation.
- 2) Sur culture d'astrocytes (cellules gliales cérébrales assurant l'homéostasie du microenvironnement neuronal) enrichis en AGPI n-3 et n-6, nous avons mesuré le transport de glucose, la production et le transport de lactate et la consommation de glucose en situation basale et en situation d'activation par le glutamate.

Ce mémoire est constitué tout d'abord d'une étude bibliographique synthétique organisée autour de 3 sections décrivant 1) les AGPI et leurs rôles sur la physiologie cérébrale, 2) le métabolisme énergétique et 3) l'impact des AGPI n-3 sur le métabolisme énergétique cérébral. L'énoncé des objectifs précède la partie des méthodes utilisées au cours de ce travail. Puis les résultats obtenus avec les approches *in vivo* et *in vitro* sont présentés et discutés. Les productions scientifiques issues de ce travail sont indiquées en annexe à la fin du mémoire, après les références bibliographiques.

# **DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES ET CONTEXTE DE L'ETUDE**



**Figure 1 : Structure et nomenclature des différentes familles d'acides gras.**



**Figure 2 : Mode d'action des enzymes  $\Delta 12$ - et  $\Delta 15$ -désaturases.** Ces enzymes sont présentes chez les végétaux et permettent d'introduire les doubles liaisons en position n-6 et n-3 à partir du 18:1n-9.

## I LES ACIDES GRAS POLYINSATURES (AGPI)

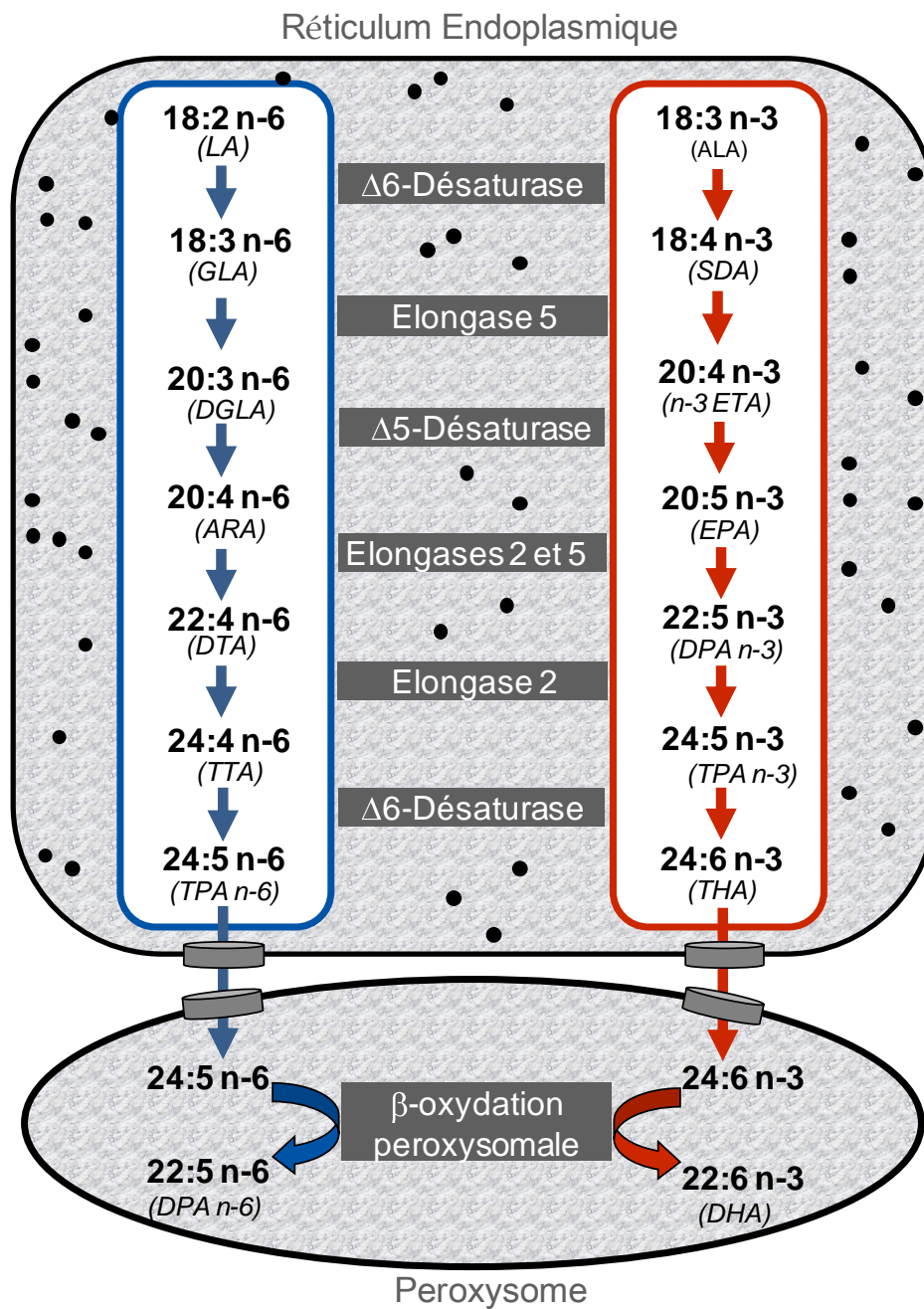
### I.1 Présentation des acides gras polyinsaturés (AGPI)

#### I.1.1 Nomenclature, métabolisme

Les acides gras sont composés d'une chaîne hydrocarbonée renfermant un nombre pair d'atomes de carbone (majoritairement de 8 à 24) et dont les extrémités comportent un groupement méthyle ( $-CH_3$ ) et carboxyle ( $-COOH$ ). Selon leur degré d'insaturation (nombre de doubles liaisons éthyléniques) on distingue 3 familles d'acides gras (Figure 1) : Saturés ou AGS (aucune double liaison), Monoinsaturés ou AGMI (une seule double liaison), Polyinsaturés ou AGPI (au moins deux doubles liaisons). Les doubles liaisons disposées le long de la chaîne hydrocarbonée des AGPI sont toutes distantes les unes des autres de 3 atomes de carbone et de configuration *cis*.

Sur le plan structural, deux familles d'AGPI se distinguent selon la position de la première double liaison en comptant à partir de l'extrémité méthyle terminale : entre les 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> atomes de carbone pour la famille des AGPI n-6, et entre les 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> pour la famille des AGPI n-3 (Figure 1). Ces 2 familles dérivent de précurseurs métaboliques qui ne sont pas synthétisés par les Vertébrés et qui sont donc exclusivement d'origine végétale, l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA ; 18:3n-3) pour la série n-3 et l'acide linoléique (LA ; 18:2n-6) pour la série n-6. Contrairement aux végétaux, en particulier les oléagineux, les Vertébrés ne possèdent pas les enzymes  $\Delta^{12}$ - et  $\Delta^{15}$ - désaturases qui permettent d'introduire dans l'acide oléique (18:1n-9) des doubles liaisons proches de son extrémité méthyle, c'est-à-dire en position n-6 et n-3, conduisant successivement à la synthèse de LA et de ALA (Figure 2). Dans l'organisme, ces deux précurseurs indispensables engendrent à leur tour des dérivés métaboliques impliqués dans de très nombreuses fonctions physiologiques.

Après leur absorption, les 2 AGPI précurseurs sont métabolisés par la même voie de bioconversion en acides gras à plus longue chaîne impliquant des étapes de désaturation-élongation et de rétroconversion peroxysomale (Figure 3). Les doubles liaisons et atomes de carbone supplémentaires sont ajoutés du côté de l'extrémité carboxyle par les enzymes désaturases et élongases, ne modifiant pas la structure n-6 et n-3 de départ. Ainsi sont



**Figure 3 : Voies de biosynthèse des acides gras polyinsaturés (AGPI) n-6 et n-3 à longue chaîne à partir des AGPI précurseurs indispensables.** LA, acide linoléique ; DTA, acide docosatétraoïque (ou adrénique) ; TTA, acide tétracosatétraoïque ; TPA, acide tétracosapentaénoïque ; THA, acide tétracosahexaoïque.

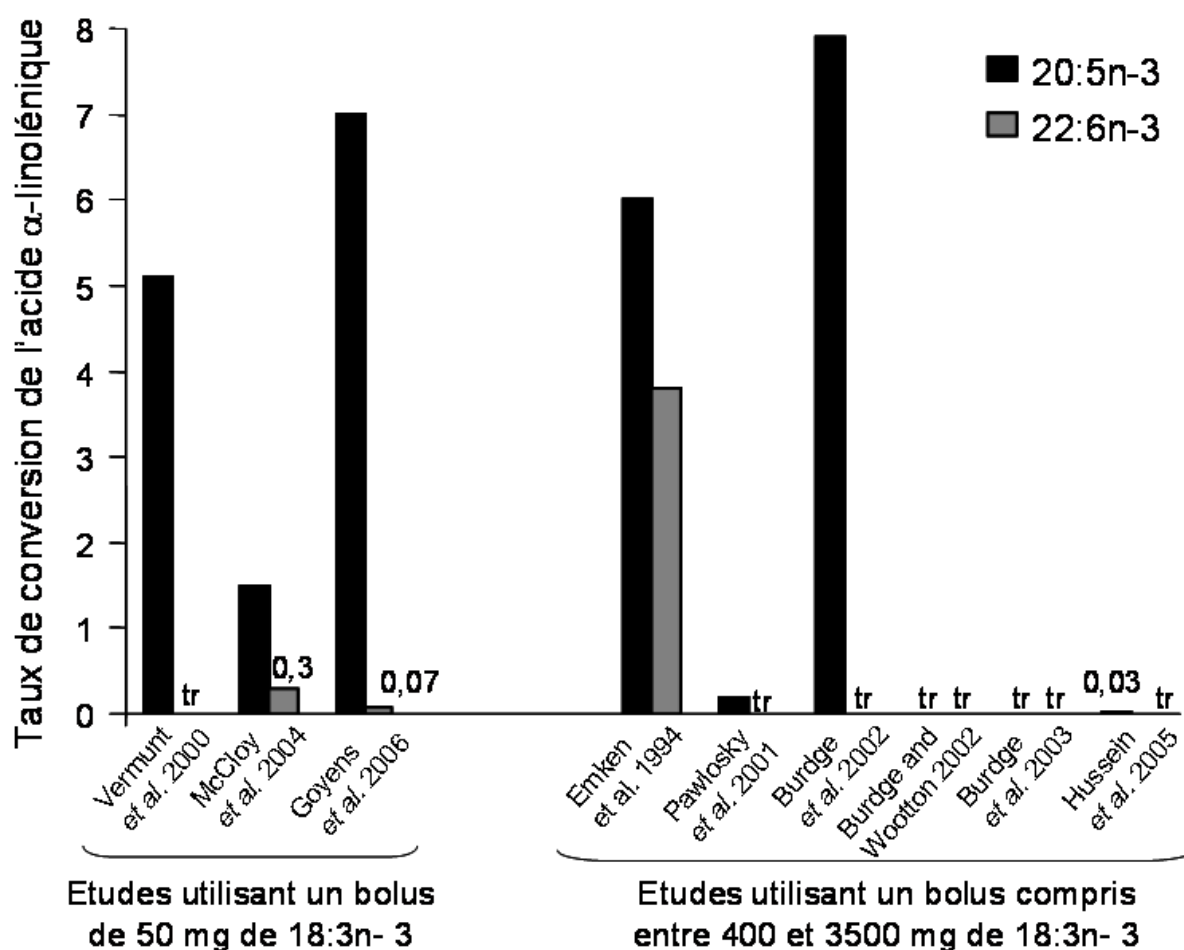
synthétisés, à partir de LA, l'acide arachidonique (AA ; 20:4n-6) et à partir de ALA, les acides eicosapentaénoïque (EPA ; 20:5n-3) et docosahexaénoïque (DHA ; 22:6n-3). Avec un apport alimentaire respectant l'équilibre entre les séries n-6 et n-3, la voie de synthèse de la série n-6 s'arrête à l'AA, mais en cas de déficience en n-3 la voie de conversion se poursuit jusqu'à l'apparition de l'acide docosapentaénoïque (DPA n-6 ; 22:5n-6). La production de DPA compense entièrement (sur le plan biochimique), la diminution de synthèse de DHA, le DPA devenant ainsi le marqueur biochimique spécifique de la déficience en AGPI n-3.

La voie de synthèse des AGPI n-6 jusqu'au 24:5n-6, et des AGPI n-3 jusqu'au 24:6n-3, s'effectue dans le reticulum endoplasmique et fait intervenir les  $\Delta^6$ - et  $\Delta^5$ - désaturases et les élongases 2 et 5 (Figure 3). La synthèse terminale de DHA et de DPA n-6 (à 22 atomes de C) nécessite une étape finale de rétroconversion par  $\beta$ -oxydation dans les peroxysomes, qui produit un clivage de 2 carbones à partir des AGPI à 24C (Figure 3).

Si la voie de conversion des AGPI précurseurs en dérivés à longue chaîne est primordiale sur le plan physiologique, elle reste cependant mineure sur le plan quantitatif. Ainsi, des études métaboliques ont montré chez le rat en croissance que seulement 3% du LA consommé étaient convertis en AGPI n-6 à plus longue chaîne, plus de 75% étant  $\beta$ -oxydés et près de 20% étant accumulés tels quels dans les membranes et surtout dans les triglycérides de réserve (principalement dans la graisse des viscères) (Cunnane et Anderson, 1997). Pour les AGPI n-3, la répartition vers la voie de conversion est encore plus minoritaire puisque seulement 1,4% du ALA ingéré est retrouvé sous la forme de ses dérivés supérieurs, tandis que 85% sont  $\beta$ -oxydés (Cunnane et Anderson, 1997). Chez l'Homme adulte, ce faible taux de conversion du 18:3n-3 est encore plus marqué car son niveau de transformation en DHA, mesuré par technique isotopique, est inférieur à 1% d'après la majorité des études (Plourde et Cunnane, 2007)(Figure 4). L'ensemble de ces données suggère que l'ALA est une source alimentaire limitée pour satisfaire la totalité des besoins en DHA des tissus humains et notamment ceux du système nerveux central au cours de la période de développement périnatal (Burdge, 2004). Cependant, puisque le taux de conversion de l'ALA en DHA est plus élevé chez la femme que chez l'homme (effet probable du statut hormonal et des oestrogènes) (Alessandri *et al.*, 2008), il est permis de penser que l'apport en ALA est aussi



important notamment pendant la période de grossesse et d'allaitement en assurant les besoins spécifiques en DHA du fœtus et du nouveau-né. Ceci résulterait également d'une



tr = traces

**Figure 4 : Taux de conversion de l'acide alpha-linolénique en dérivés n-3 supérieurs [acides eicosapentaénoïque (EPA, 20 :5n-3) et docosahexaénoïque (DHA, 22 :6n-3)] chez l'homme adulte omnivore en bonne santé estimé au moyen d'isotopes stables (d'après Plourde et Cunnane, 2007).**

moindre utilisation chez la femme de l'ALA à des fins énergétiques par  $\beta$ -oxydation, du fait d'une masse musculaire moins importante (Burdge, 2004) (répartition différente en "amont"), et/ou d'une activité de synthèse terminale du DHA élevée (production différente "en aval") (Alessandri *et al.*, 2009, Extier *et al.*, 2010). Des études visent à identifier les étapes métaboliques permettant d'expliquer ce faible taux de conversion chez les humains, en particulier chez l'homme (Jensen *et al.*, 1996 ; Alessandri *et al.*, 2007 ; Gregory *et al.*, 2010).

De façon générale, les différents tissus de l'organisme possèdent tout ou en partie l'équipement enzymatique nécessaire à la synthèse des AGPI à longue chaîne. Toutefois, concernant les acides gras en n-3, le foie joue un rôle central car il permet l'essentiel de la biosynthèse pour l'organisme, et notamment pour le tissu nerveux, (Bourre *et al.*, 1989 ; Rapoport, 2007). En effet, suite à un bolus d'ALA radiomarké, l'apparition de DHA marqué s'effectue dans un premier temps au niveau du foie, puis, dans un second temps au niveau du plasma et rapidement du cerveau et de la rétine, tandis que la concentration de DHA marqué au niveau du foie diminue (Scott et Bazan, 1989 ; Martin *et al.*, 1994). Par ailleurs, la quantité de DHA néosynthétisé par le cerveau à partir de l'ALA est largement inférieure à la quantité requise par l'ensemble des cellules nerveuses (0,002 $\mu$ mole vs 0,30 $\mu$ mole/jour) (Rapoport *et al.*, 2010). En revanche, le niveau de synthèse-sécrétion hépatique excède largement le seul besoin cérébral (10 $\mu$ moles/jour). Le rôle central du foie est également mis en valeur par les mécanismes de régulation mis en jeu exclusivement dans ce tissu (activation des désaturases) notamment en situation de déficit d'apport alimentaire en n-3 (Rapoport *et al.*, 2010). De plus, il a été montré au laboratoire que cette activation en réponse à des apports insuffisants en ALA est plus forte chez les rats femelles que chez les mâles (Extier *et al.*, 2010, Alessandri *et al.*, 2011).

Enfin, il est à noter qu'il existe chez l'Homme une grande variabilité interindividuelle du niveau de biosynthèse des AGPI à longue chaîne (de 1 à 25 chez le nourrisson pour le DHA) que l'on associe notamment au polymorphisme des gènes fatty acid desaturase 2 ( $\Delta$ -6) et fatty acid desaturase 1 ( $\Delta$ -5) (Lattka *et al.*, 2010). En effet il a été récemment identifié un certain nombre de mutations simples au niveau de ces deux enzymes, qui rendraient compte de près de 30% de la variance de la teneur plasmatique en AA mesurée chez les hommes adultes. Ainsi, les porteurs de ces allèles mineurs présenteraient une réduction des activités

des désaturases se traduisant par une concentration élevée en LA mais réduite en AA. Ce polymorphisme semble moins affecter le métabolisme des AGPI n-3.

	Besoins physiologiques	Prévention du risque					Références nutritionnelles
		Diabète Obésité	Pathologies Cardiovasculaires	Cancers sein, colon	Troubles neurologiques	Autres pathologies DMLA	
Lipides totaux	30	30-40	35-40	35-40	35-40	<40	35-40
LA	2	2	5	2	2	<4	4
ALA	0,8	0,8	1	0,8	0,8	0,8	1
DHA	0,113 (250mg)	0,225 (500mg)	0,225-0,338 (500-750mg)	0,225 (500mg)	0,225 (500mg)	0,225 (500mg)	0,113 (250mg)
EPA	-						0,113 (250mg)

**Tableau 1 : Apports Nutritionnels Conseillés (ANC) (en % de l'apport énergétique) pour un adulte consommant 2000kcal/jour.** Les ANC (références nutritionnelles) tiennent compte des valeurs estimées pour couvrir les besoins physiologiques et limiter l'incidence des pathologies. AFSSA, 2010.

DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge

### I.1.2 Recommandations

L'intérêt nutritionnel des AGPI et notamment des dérivés à longue chaîne de la série n-3 a fait l'objet d'un grand nombre d'investigations sur la prévention et la thérapie de certaines pathologies du système nerveux central (Astorg *et al.*, 2006 ; Calder et Yaqoob, 2009). On a constaté en France un déséquilibre d'apport alimentaire en acides gras polyinsaturés (AGPI) de la famille n-6 et n-3. Le rapport n-6/n-3 est environ de 10, soit le double de la recommandation faite par l'AFSSA. En 2010, l'AFSSA a publié de nouvelles recommandations ou apports nutritionnels conseillés (ANC) selon lesquelles un homme adulte devrait consommer chaque jour 2,7g d'AGPI n-3 et 9g d'AGPI n-6. L'ANC est une valeur de référence qui couvre les besoins physiologiques de la population en bonne santé dans son ensemble. Les ANC sont établies sur la base d'un apport énergétique total de 2000kcal/j pour les hommes et de 1800kcal/j pour les femmes, considérant que les lipides doivent représenter 33% de l'apport énergétique total (Tableau 1). Pour les populations particulières telles que les enfants, les nourrissons, les femmes enceintes ou allaitantes les recommandations vont être adaptées (voir paragraphe I.3.2.2).

## I.2 Propriétés des acides gras polyinsaturés

### I.2.1 Rôle structural

L'acide linoléique, l'AA et le DHA sont les principaux AGPI constituants des phospholipides membranaires. Ils modulent l'action de différents acteurs de la signalisation inter- et intracellulaire (enzymes, transporteurs, récepteurs, canaux ioniques). Ils interviennent de façon directe en constituant un microenvironnement peu ordonné et flexible, facilitant ainsi les changements de conformation nécessaire à l'activité de protéines intrinsèques, ou indirectement en induisant la ségrégation de domaines membranaires plus ordonnés, enrichis en acides gras saturés, en phosphatidylcholine, en glycosphingolipides et en cholestérol (les rafts) auxquels sont associés des complexes protéiques actifs (Shaikh *et al.*, 2003, Wassall *et al.*, 2004). En effet, la faible affinité du cholestérol pour les phospholipides les plus riches en DHA (phosphatidyléthanolamine) pourrait servir de mécanismes de sélection dans la formation des rafts. L'importance de la teneur membranaire en AGPI est parfaitement illustrée au niveau des cellules photo-réceptrices de la rétine où la réception du photon et sa transduction en signal électrique nécessitent des

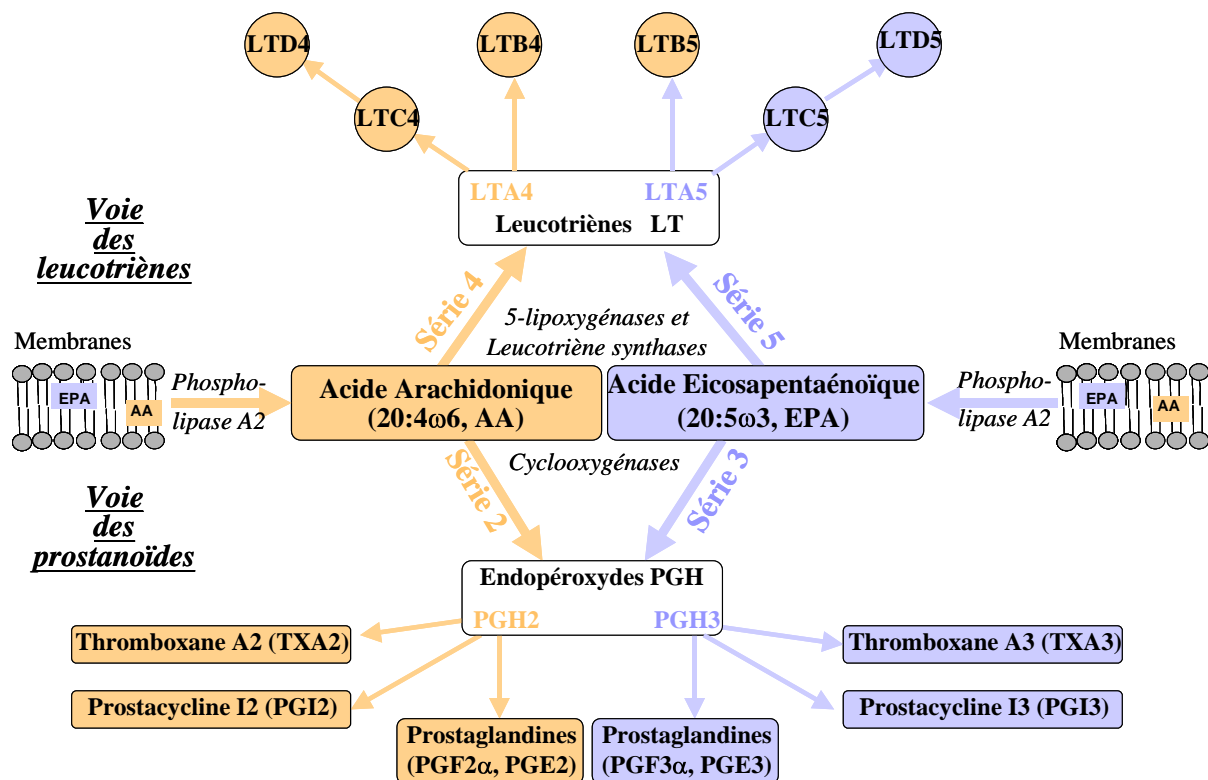
changements très rapides et réversibles de la conformation de la rhodopsine, le photopigment rétinien. Ces changements sont modulés directement par la composition en phospholipides des membranes photo-réceptrices et notamment par la concentration en DHA, particulièrement élevée dans les membranes excitables de la rétine (Salem *et al.*, 2001). Le rôle structural du DHA peut également intervenir au niveau de la signalisation cellulaire. Par exemple, l'équipe de Kim (Kim *et al.*, 2000), a montré que l'apoptose induite *in vitro* par la staurosporine (un inhibiteur des kinases) est ralentie après un enrichissement membranaire en DHA. Cet effet anti-apoptotique du DHA dépendrait de la voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase/Akt et de la capacité du DHA à favoriser l'accumulation membranaire de la phosphatidylsérine qui elle-même stimule l'activité d'Akt (Akbar et Kim, 2002).

### I.2.2 Rôle de médiateurs lipidiques

Les AGPI à 20 atomes de carbone [acide dihomog- $\gamma$ -linolénique (DGLA, 20:3n-6) ; AA et EPA] conduisent, par leur entrée dans des voies enzymatiques d'oxygénation, d'hydroxylation ou de peroxydation, à la formation de puissants médiateurs de la signalisation cellulaire qui ciblent l'ensemble des tissus de l'organisme. L'entrée des AGPI dans ces voies métaboliques requiert tout d'abord l'hydrolyse de la liaison ester en position sn-2 des phospholipides membranaires sous l'action d'une phospholipase de type A2 (PLA<sub>2</sub>). Les AGPI ainsi libérés peuvent emprunter deux voies métaboliques principales : la voie des cyclooxygénases générant les prostanoïdes (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes) ou la voie de la lipoxygénase conduisant à la synthèse des acides gras hydroperoxydés et hydroxylés puis aux leucotriènes (Guesnet *et al.*, 2005)(Figure 5). Pour chaque famille de molécule, on distingue trois séries selon la nature de l'AGPI (chaque tissu possède l'équipement enzymatique permettant la synthèse spécifique de l'une ou l'autre molécule).

Ces molécules oxygénées régulent des fonctions aussi diverses que la reproduction, la physiologie cardiaque, la coagulation sanguine, l'hémostase, l'inflammation, le fonctionnement des glandes endocrines et exocrines... Parmi ces molécules, citons le thromboxane A2 (TXA<sub>2</sub>), issu de la conversion de l'AA au niveau des plaquettes sanguines, qui est un puissant inducteur de l'agrégation plaquettaire. La prostacycline I2 (PGI<sub>2</sub>), produite par les cellules endothéliales, exerce un effet vasodilatateur vis-à-vis du système

vasculaire et anti-agrégant au niveau des plaquettes. L'équilibre entre la production de TXA2 et de PGI2 constitue un élément clé de l'hémostase sanguine (Figure 5). Les leucotriènes



**Figure 5 : Métabolisation des AGPI par les voies des cyclooxygénases (conduisant à la formation des prostanoides) et de la lipoxygénase (conduisant à la formation des leucotriènes).** Chaque famille de molécules comporte 3 séries selon la nature de l'AGPI précurseur. Ces molécules régulent des fonctions diverses : reproduction, coagulation sanguine, hémostase, inflammation...

modulent l'activité du système immunitaire en contrôlant la différenciation et les fonctions des lymphocytes T, des mastocytes et des macrophages. La prostaglandine E2 (PGE2) exerce également de multiples effets pro-inflammatoires (Boyce, 2005). Les effets des médiateurs dérivés de l'AA, de l'EPA et du DHA mettent également en œuvre l'activation de facteurs de transcription tels que les récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs).

Depuis le début des années 2000, il a été montré que la conversion enzymatique de l'EPA et du DHA conduit également à la formation de résolvines, intervenant dans la résorption des processus inflammatoires, et de neuroprotectines jouant un rôle anti-apoptotique dans le cerveau (Serhan *et al.*, 2004). Ces molécules exercent un puissant effet anti-inflammatoire qui va à l'encontre de l'effet des dérivés issus de l'AA. Dans des études *in vitro*, il a été montré que le DHA et l'EPA répriment l'expression des cytokines inflammatoires (TNF, IL) et également l'expression de gènes impliqués dans le processus d'inflammation (NF $\kappa$ B, PPAR $\gamma$ ) (Calder, 2008).

Par ailleurs, l'AA est un précurseur de molécules actives chez le mammifère et importante pour le système nerveux central, les endocannabinoïdes. Les endocannabinoïdes régulent le métabolisme des neurotransmetteurs (libération de dopamine) et possèdent des propriétés neuroprotectrices. Leur rôle physiologique n'a pas été entièrement élucidé mais on sait que leur concentration cérébrale est très dépendante de l'apport alimentaire en AGPI. Ainsi, la consommation d'AGPI n-3 à longue chaîne sous la forme d'huile de poisson modifie la balance n-6/n-3 et a donc une répercussion sur la synthèse des endocannabinoïdes au niveau cérébral (Wood *et al.*, 2010). Récemment il a été montré que la déficience en AGPI n-3 réduit l'activité des récepteurs CB1R aux cannabinoïdes (Lafourcade *et al.*, 2011).

### I.2.3 Rôle de régulateurs de l'expression génique

Les acides gras et leurs métabolites comme les prostacyclines régulent l'expression d'un grand nombre de gènes par l'intermédiaire de multiples facteurs de transcription, parmi lesquels les plus importants sont les PPARs, la protéine de liaison à l'élément de régulation des stérols (SREBP-1c pour « sterol regulatory element binding protein-1c »), les

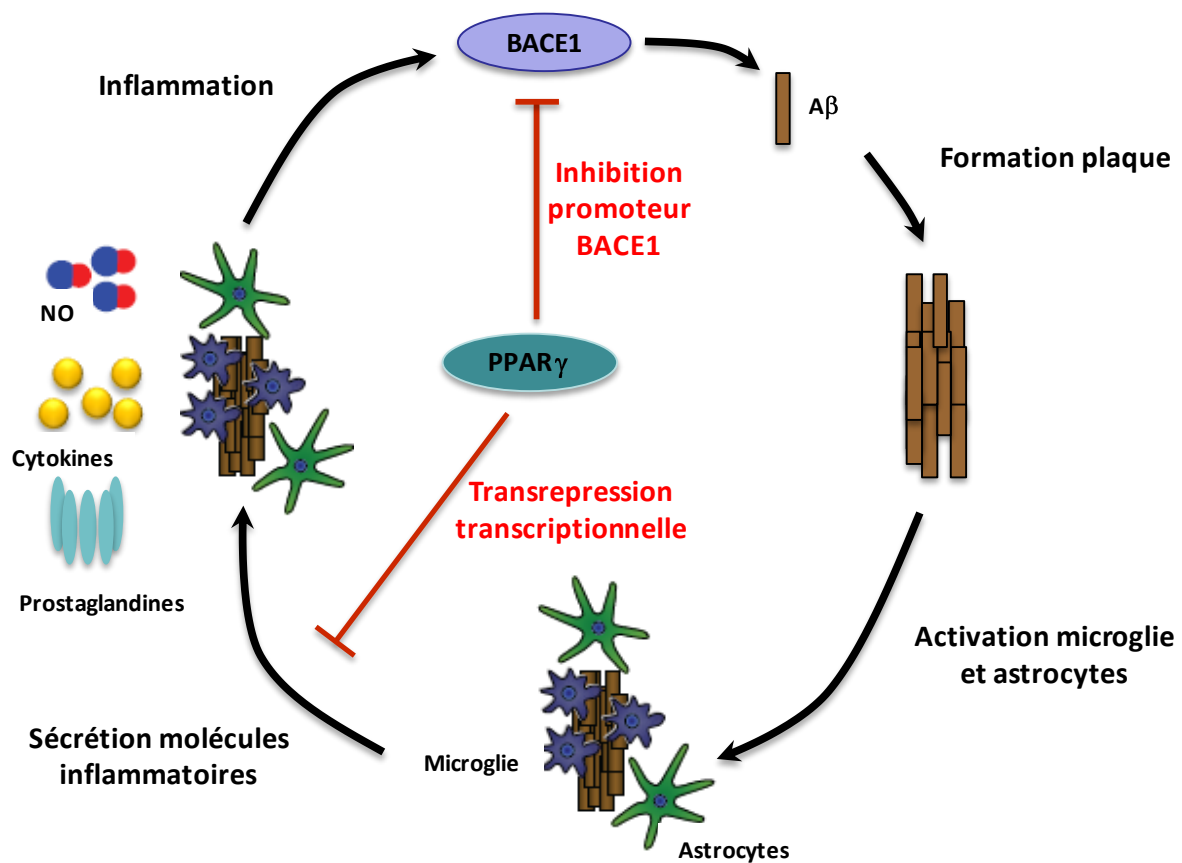
facteurs nucléaires hépatiques (HNF4 pour « hepatic nuclear factor 4 »), le récepteur aux rétinoïdes (RXR $\alpha$  pour « retinoid X receptor ») et le récepteur hépatique X (LXR $\alpha$  pour « liver X receptor ») (Guesnet *et al.*, 2005). Le dysfonctionnement de ces facteurs de régulation est déterminant dans le processus de résistance à l'insuline et des pathologies qui lui sont associées (diabète de type 2, syndrome métabolique). La régulation génique s'effectue au niveau des noyaux des cellules par interaction directe des acides gras ou de leurs dérivés oxygénés (liaison comme ligands endogènes) avec ces récepteurs nucléaires (PPAR, HNF4, RXR $\alpha$ , LXR $\alpha$ ) ou de façon indirecte en inhibant la transcription du récepteur lui-même (SREBP-1c). Le foie et le tissu adipeux sont particulièrement concernés par ces processus de régulation. Il a été démontré que les AGPI stimulent la voie catabolique des acides gras en activant la transcription de protéines de transport et d'enzymes de la  $\beta$ -oxydation (mitochondriale et peroxysomale) et de cétogenèse des acides gras. En outre, les AGPI réduisent l'activité lipogénique du tissu hépatique en réprimant la transcription de facteurs et d'enzymes lipogéniques (Clarke, 2001 ; Jump *et al.*, 2005).

Il existe 3 isoformes de PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  et  $\gamma$  avec une présence différente en fonction des tissus. PPAR $\gamma$  se trouve majoritairement dans le tissu adipeux, où il intervient dans la différenciation adipocytaire, le stockage des lipides et la lipogenèse (He *et al.*, 2003). PPAR $\alpha$  est surtout exprimé dans le foie, mais également dans le cœur et les muscles où il joue un rôle dans l'oxydation des lipides (Reddy, 2001). PPAR $\beta/\delta$  est la forme la plus ubiquitaire. En relation avec cette répartition, les 3 isoformes ont des rôles spécifiques dans la régulation du métabolisme énergétique (Evans, 2004). Les 3 isoformes sont présentes dans le système nerveux central pendant la dernière phase de l'embryogénèse du rat. Alors que PPAR $\beta/\delta$  reste fortement exprimé (Hall, 2008), l'expression de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  diminue après la naissance (Braissant, 1998). Chez l'adulte, PPAR $\beta/\delta$  a été mis en évidence dans l'ensemble du cerveau, et PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  dans des zones plus restreintes (Moreno, 2004).

Les PPARs exercent des rôles importants dans divers pathologies du SNC, comme par exemple la maladie d'Alzheimer. Dans cette maladie, la formation de plaques d'amyloïde A $\beta$  déclenche l'activation de la microglie et des astrocytes qui répondent par la sécrétion de molécules inflammatoires. Les cytokines sécrétées activent le gène de la  $\beta$ -sécrétase 1 (BACE1) qui stimule la production de molécules A $\beta$ . PPAR $\gamma$  peut inhiber ce



processus à deux niveaux, en réprimant la transcription des cytokines et en bloquant la séquence promotrice du gène BACE1 (Figure 6 d'après Kummer et Heneka, 2008).



**Figure 6 : Effets des PPAR $\gamma$  sur la formation des plaques amyloïdiennes.** Dans ce processus PPAR $\gamma$  agit comme un antagoniste soit par une action directe sur la sécrétion de facteurs inflammatoires par la microglie soit par une action sur la séquence promotrice du gène de la  $\beta$ -sécrétase BACE1 (d'après Kummer et Heneka, 2008).

Des études *in vitro* ont mis en évidence un rôle protecteur de PPAR $\gamma$  et PPAR $\delta$  vis-à-vis de l'inflammation (Diab *et al.*, 2002 ; Polak *et al.*, 2005). PPAR $\delta$  est également impliqué dans la différenciation des oligodendrocytes, cellules responsables de la synthèse de myéline. La mortalité postnatale importante observée chez les souris KO pour PPAR $\delta$  témoigne de son importance dans le développement et le fonctionnement cérébral (Peters, 2000 ; Almad et McTigue, 2010).

### **1.3 Les acides gras polyinsaturés et le système nerveux central (SNC)**

Particularités des lipides de structure du cerveau

*Le cerveau – un tissu exceptionnellement riche en DHA dont l'accumulation s'effectue principalement au cours de la période périnatale.* Le système nerveux central est un tissu très riche en lipides, dont la concentration dans le cerveau représente 30% du poids sec. Il renferme également des concentrations importantes d'AGPI des deux séries, n-6 principalement sous la forme d'AA, et n-3 principalement le DHA. Les lipides totaux du cerveau humain contiennent environ 7% en masse de DHA soit une concentration 2 fois plus élevée que dans le foie et le placenta (Lauritzen *et al.*, 2001). L'AA est présent à un niveau équivalent de concentration, tandis que les AGPI précurseurs ne le sont qu'à l'état de trace. La rétine se distingue à la fois par son exceptionnelle richesse en DHA (environ 20%) et sa faible teneur en AA. Cette concentration élevée en DHA, caractéristique du système nerveux des mammifères, est particulièrement marquée au niveau de certaines classes de phospholipides (phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine) constituant les membranes des cellules nerveuses et rétinienne. Ainsi, chez le rat recevant un régime adéquat en AGPI n-3, le DHA atteint des valeurs proches de 25% dans les GPE des zones cérébrales (cortex frontal), et peut approcher 40 à 50% dans cette classe de phospholipides des membranes excitables (synapses et segments externes des bâtonnets de la rétine).

#### **1.3.1.1 Spécificités des types cellulaires : teneurs et métabolisme**

Les études conduites *in vivo* suggèrent que l'activité de synthèse des AGPI à longue chaîne (notamment de la série n-3) est faible au niveau cérébral. Chez le rat, seulement 0,2% de la dose d'acide  $\alpha$ -linoléique (1-C<sup>14</sup>) injectée par voie intraveineuse est convertie en DHA, la plus grande part étant rapidement (5min) dégradée *in situ* par voie oxydative (Rapoport,

2007). Selon ces travaux, le DHA cérébral proviendrait exclusivement du DHA produit par le foie, libéré dans la circulation sanguine puis capté à travers la barrière hémato-encéphalique par le cerveau. Chez le rat, le niveau de synthèse hépatique serait 10 fois supérieur à celui des besoins spécifiques du cerveau (2,2 vs 0.2  $\mu$ moles/jour) (Rapoport, 2007). Cependant, ces études ayant été réalisées chez l'animal adulte, le gain d'incorporation du DHA dans les membranes cérébrales devait être de faible amplitude dans la mesure où le plateau d'incorporation du DHA était déjà atteint (Alessandri *et al.*, 2003). L'hypothèse d'une activité de synthèse cérébrale potentiellement active, notamment au cours de la période périnatale où l'accumulation cérébrale de DHA est importante (Cunnane, 2000) ne peut être exclue, d'autant que des études *in vitro* montrent que les cellules nerveuses possèdent la capacité métabolique de désaturer et d'allonger les AGPI précurseurs.

Les études menées au laboratoire se sont intéressées aux trois types cellulaires qui coopèrent à l'activité neuronale mais également au métabolisme des AGPI : le neurone, l'astrocyte et la cellule endothéliale.

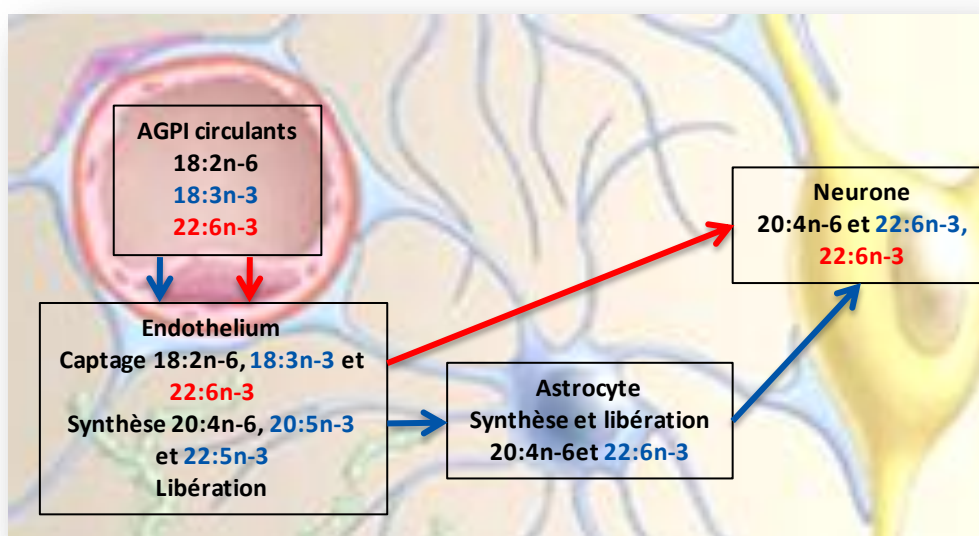
Les astrocytes sont des cellules gliales de forme étoilée avec de longs prolongements. Elles peuvent avoir des morphologies différentes en fonction de leur degré de maturation, leur localisation cérébrale et lors de conditions physiologiques particulières. Les prolongements de ces cellules se terminent souvent par une partie plus large appelée « pied astrocytaire » qui vient au contact des neurones, de la synapse et des cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Les astrocytes forment un réseau grâce aux jonctions communicantes. Par exemple, lors de la capture des ions  $K^+$  dans la régulation de l'homéostasie, l'organisation des astrocytes en réseau permet alors d'augmenter le volume cytoplasmique pour permettre d'éliminer l'excès d'ions  $K^+$  (Hansson *et al.*, 2000).

Dans les neurones et les astrocytes, la quantité d'AGPI représente environ 30% des acides gras contenus dans les lipides totaux, avec plus d'AA que de DHA pour les neurones (15 vs 8%) et pour les astrocytes la même proportion est observée (environ 10%) (Tableau 2, d'après Bourre *et al.*, 1995).

Le métabolisme des AGPI a été étudié dans les différents types cellulaires cérébraux en utilisant les précurseurs (18:2n-6 et 18:3n-3) radiomarqués donnés à des doses physiologiques. L'utilisation de molécules radiomarquées a permis de valider l'existence de la voie métabolique de bioconversion des AGPI dans le cerveau, d'en étudier les étapes

Types cellulaires	AGPI (% des acides gras totaux)	20:4 n-6 (% des acides gras totaux)	22:6 n-3 (% des acides gras totaux)
Neurones	32	15	8
Oligodendrocytes	20	9	5
Astrocytes	29	10	11
Microvaisseaux	35	16	10
Mitochondries	30	16	12
Microsomes	29	11	12

**Tableau 2 : Teneur en acides gras polyinsaturés des phospholipides totaux dans les différents types cellulaires cérébraux.** (d'après Bourre et *al.*, 1995)



**Figure 7 : Modèle de captage et de synthèse des AGPI longues chaines dans le cerveau à partir des AGPI présents dans la circulation sanguine** (d'après Moore, 2001)

limitantes et de vérifier la bonne incorporation dans les phospholipides membranaires des AGPI dérivés. L'utilisation du modèle de lignée de neuroblastomes humains (cellules SH-SY5Y) a mis en évidence que ces cellules expriment les principaux gènes de la voie de conversion, notamment les désaturases, et qu'elles sont capables de synthétiser et d'incorporer dans les phospholipides membranaires du DHA à partir du 18:3n-3 dans une fourchette de concentration physiologique (<15µM) (Langelier *et al.*, 2005, Alessandri *et al.*, 2008). Le niveau atteint en DHA néoformé reste cependant inférieur à celui résultant de la supplémentation du milieu de culture en DHA préformé.

Des études *in vitro* utilisant des molécules radiomarquées ont mis en évidence que les astrocytes sont capables de convertir l'acide- $\alpha$ -linoléique en DHA (Moore, 2001) et de le libérer dans le milieu de culture (Moore, 1990), ce qui suggère que l'apport de DHA au neurone serait en partie pourvu par l'astrocyte (Figure 7). Cependant, il a été montré qu'une supplémentation des cultures d'astrocytes avec de l'acide- $\alpha$ -linoléique ou de l'EPA à des concentrations physiologiques (entre 10 et 50µM) conduit à une diminution de la teneur en DHA liée à l'accumulation du 22:5n-3 (intermédiaire dans la voie de conversion) (Innis et Dyer, 2002). Ainsi la conversion du 18:3n-3 en 22:6n-3 serait limitée au niveau du passage du 22:5n-3 en 22:6n-3, ce qui est également le cas dans les cellules SH-SY5Y (Alessandri *et al.*, 2008). Pour obtenir une incorporation optimale du DHA dans les membranes, c'est-à-dire comparable aux concentrations observées *in vivo*, seule la supplémentation directe du milieu de culture avec du DHA préformé s'avère efficace (Innis et Dyer, 2002 ; Champeil-Potokar *et al.*, 2004).

En ce qui concerne les cellules endothéliales, des études *in vitro* ont permis de montrer leur capacité à synthétiser de l'AA et du DHA à partir de leurs précurseurs mais avec, dans ce modèle cellulaire également, une synthèse limitée du DHA à partir du 18:3n-3 ou du 20:5n-3. En effet la conversion à partir du 22:5n-3 est inférieure à 1%, cette étape limitante pourrait être due à l'étape d'élongation du 22:5n-3 en 24:5n-3 et à la désaturation par la  $\Delta 6$ -désaturase du 24:5n-3 en 24:6n-3 (Moore, 2001). Cependant, le DHA synthétisé à partir du 22:5n-3 est sécrété dans le milieu de culture, tandis que l'AA néo-synthétisé est préférentiellement incorporé dans les membranes cellulaires, ce qui suggère que les cellules endothéliales pourraient contribuer à l'approvisionnement du cerveau en sécrétant le DHA

nouvellement synthétisé afin de le fournir aux neurones (Figure 7) (Delton-Vandenbroucke *et al.*, 1997 ; Benistant *et al.*, 1995 ; Moore, 2001).

### 1.3.2 Les acides gras polyinsaturés et la période périnatale

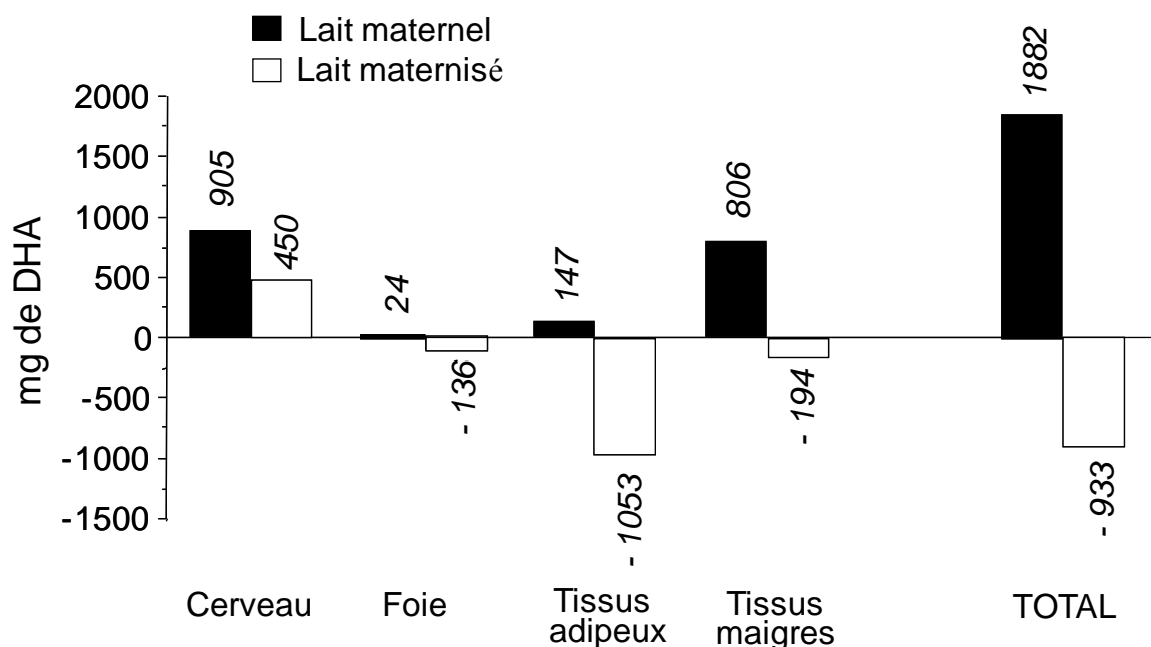
#### 1.3.2.1 *Les apports des AGPI au cerveau*

L'incorporation des AGPI à longue chaîne au niveau cérébral se réalise tout le long de la période périnatale. Chez l'Homme, l'accumulation de DHA se produit au cours du dernier trimestre de grossesse, période active de neurogenèse et de maturation cellulaire, et également pendant les 2 premières années de la vie. On estime à 3mg/jour le taux d'incorporation du DHA pendant le dernier trimestre de la grossesse et à 5mg/jour pendant la période d'allaitement (Cunnane *et al.*, 2000). Pendant les 6 premiers mois de la vie postnatale, le cerveau accumule 50% de la totalité du DHA incorporé dans l'ensemble de l'organisme, soit environ 900mg (Figure 8). Le taux de conversion des AGPI dans le placenta et le fœtus étant limité, le DHA et l'AA nécessaire au développement du fœtus proviennent principalement du métabolisme et des lipides circulants maternels, ce qui nécessite leur transfert fœto-placentaire. Le mécanisme de transfert de la mère vers le fœtus n'est pas bien connu mais des études suggèrent que ce processus implique pour le DHA des systèmes de transports membranaires *via* des protéines spécifiques telles que Fatty Acid Transporter proteins 1 et 4 (FATP1 et 4) et la placental plasma membrane fatty acid binding protein (pFABPpm)(Cunningham et McDermott, 2009 ; Duttaroy, 2009). L'implication du transporteur FAT/CD36 n'a pas été clairement établie (Cunningham et McDermott, 2009). Par ailleurs, les acides gras polyinsaturés et leurs dérivés sont des ligands activateurs des récepteurs nucléaires (PPARs, LXR, RXR, SREBP-1) impliqués dans le développement placentaire notamment dans la régulation des protéines de transport des acides gras (Barak, 2008 ; Duttaroy, 2009 ). Après la naissance et pendant les 6 premiers mois de vie, le lait (maternel ou artificiel) est la seule source d'apport en AGPI n-3 et n-6.

#### 1.3.2.2 *Incidence de la déficience alimentaire en AGPI n-3*

A partir des années 70, des expérimentations conduites chez des animaux (rongeurs et primates) carencés en AGPI n-3 pendant la période de gestation-lactation ont commencé à mettre en évidence l'importance de ces acides gras pour le système nerveux central du nouveau-né, notamment en termes d'apprentissage cognitif et d'acuité visuelle (Wheeler *et al.*, 1975 ; Bourre *et al.*, 1989). Dans ces études, il apparaît que la déficience entraîne une

diminution marquée de la teneur cérébrale en DHA, comprise entre 50 et 80% selon les protocoles utilisés. La présence résiduelle de DHA résulte des capacités métaboliques du cerveau à capter et préserver une concentration minimum en cet AGPI. En effet, des études



**Figure 8 : Quantité de DHA accumulée au cours des 6 premiers mois de vie dans l'organisme du nourrisson allaité au sein ou avec une formule commerciale classique.**

(d'après Cunnane *et al.*, 2000)

	LA	ALA	AA	DHA	EPA + DHA
<b>Femme enceinte</b>	4,0	1,0	-	0,11% AE (250mg)	500mg
<b>Femme allaitante</b>	4,0	1,0	-	0,11% AE (250mg)	500mg
<b>Nouveau-Né/Nourrisson</b>	2,7	0,45	0,23% AE (0,5% AGT)	0,09% AE (0,2% AGT)	EPA < DHA
<b>Enfant (1-3 ans)</b>	2,7	0,45	-	70mg	70mg
<b>Enfant (3-9 ans)</b>	4,0	1,0	-	125mg	250mg
<b>Adolescent (10-18 ans)</b>	4,0	1,0	-	250mg	500mg

**Tableau 3 : ANC en acides gras polyinsaturés précurseurs et longues chaînes en fonction de l'âge.** Les valeurs sont exprimées en % AE : Apport énergétique ; AGT : Acides gras totaux ; - absence de données justifiant des recommandations. Les valeurs pour la femme enceinte et allaitante sont pour une consommation journalière de 2050kcal et 2250kcal, respectivement avec 35-40% de la ration énergétique sous

forme de lipides. Les valeurs pour le nouveau-né sont pour un lait apportant 70kcal et 3,4g de lipides totaux pour 100ml reconstitués.

conduites chez le rat adulte démontrent que le turn-over du DHA dans les phospholipides cérébraux est fortement ralenti en cas de déficience, puisque sa demi-vie atteint 90 jours chez les rats recevant un régime déficient en AGPI n-3 contre 33 jours chez les rats contrôles (DeMar *et al.*, 2004). La période périnatale représente une fenêtre critique pour le développement cérébral, correspondant à l'influence que les apports en lipides exercent sur la composition en acides gras du cerveau. Des études cliniques réalisées chez des nourrissons allaités au biberon ont montré qu'il existe une relation entre la teneur en DHA des laits infantiles et le développement cérébral évalué sur la base de tests d'acuité visuelle (Guesnet et Alessandri, 2011). Les enfants recevant un lait pauvre en ALA (0,5%) et déséquilibré par un apport excessif en acide linoléique présentaient un niveau d'acuité visuelle significativement réduit par rapport à ceux recevant un lait contenant 2,7% d'ALA. De plus, lorsque le DHA préformé était ajouté dans la formule lactée à 1,4% d'ALA, la performance au test visuel était encore améliorée et le développement de l'acuité visuelle des enfants supplémentés en DHA devenait identique à celui d'enfants allaités au sein pris comme référence physiologique. Ces données ont conduit les comités d'experts en nutrition infantile et l'AFSSA en 2010 à proposer des recommandations en apport en AGPI n-3 pour les nouveau-nés (ALA : 0,45-1,5% d'énergie ; DHA : 0,09-0,23% d'énergie), les femmes enceintes (ALA : 1% d'énergie ; DHA : 0,11% d'énergie) et allaitantes (ALA : 1% d'énergie ; DHA : 0,10% d'énergie) (Tableau 3).

Des expériences de réversibilité de la déficience réalisées chez le rat montrent qu'il est possible par une réalimentation équilibrée de rétablir la teneur membranaire cérébrale en DHA à condition qu'elle soit réalisée avant l'âge du sevrage. Cependant, en dépit de la normalisation de la teneur en DHA la réponse physiologique du cerveau reste altérée, comme en témoigne l'altération du processus de neurotransmission dopaminergique apprécié par le niveau de libération de la dopamine (Kodas *et al.*, 2002). D'autres auteurs (Moriguchi et Salem, 2003) utilisant le même protocole ont confirmé que la période de sevrage constitue l'âge critique pour rétablir la composition membranaire cérébrale affectée par une déficience prénatale. De plus, les mêmes auteurs montrent que la durée de la



réalimentation nécessaire à la normalisation de la réponse comportementale doit être d'au moins 6 semaines.

#### 1.3.2.3 Neurogenèse et neurodéveloppement

La neurogenèse est un processus dynamique conduisant, à partir de cellules souches neurales, à la multiplication et à la formation de cellules neurales différenciées (lignées neuronale et gliale), puis à la mise en place de ces dernières cellules dans leurs zones cérébrales de destination. Elle est particulièrement active au cours du développement cérébral embryonnaire pour notamment établir l'ensemble des réseaux neuronaux, et existe également dans certaines zones chez l'adulte. Elle intervient en particulier dans les processus d'acquisition d'informations nouvelles (gyrus denté de l'hippocampe, région sous-ventriculaire). Un ensemble d'études *in vivo* et *in vitro* suggère que les AGPI n-3 modulent la neurogenèse aux différents stades de la vie (développement, âge adulte, vieillissement). Dans l'étude de Coti Bertrand *et al.* (2006), des analyses morphométriques ont montré une réduction significative de 25 à 50% de la taille des structures télencéphaliques comme la plaque corticale, l'hippocampe et le gyrus denté chez le rat déficient en AGPI n-3, tandis qu'il était observé une augmentation des zones sous-ventriculaires contenant les cellules progénitrices. Sur le modèle murin transgénique fat-1 (qui rend possible la production de n-3 à partir de n-6) une augmentation de la neurogenèse a été mise en évidence au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe (nombre de neurones pyramidaux, taille et nombre de neurites, densité des épines dendritiques) liée à des teneurs cérébrales en DHA particulièrement élevées par rapport à la souche sauvage (He *et al.*, 2009). Chez l'animal âgé, il a été également montré que le DHA pouvait stimuler la neurogenèse en inhibant la mort cellulaire tout en stimulant la différenciation des cellules souches en neurones (Kawakita *et al.*, 2006). Des études *in vitro* sur des cultures de neurosphères (cellules souches neurales) confirment l'effet positif observé *in vivo* des AGPI n-3 sur la neurogenèse. Le DHA, ajouté au milieu de culture à des doses comprises entre 1 et 10 $\mu$ M, augmente le nombre de cellules exprimant le marqueur neuronal Tuj1 mais en limitant le niveau de division cellulaire (Kawakita *et al.*, 2006 ; He *et al.*, 2009). De plus le DHA favorise la croissance des neurites des neurones différenciés (Novak *et al.*, 2008). Les travaux de Katakura *et al.* (2009) suggèrent un effet du DHA sur la régulation de facteurs de transcription (RXR, PPAR) qui

interviennent dans la sortie des cellules progénitrices de leur cycle cellulaire afin de permettre leur différenciation en neurones.

### I.3.3 Rôles physiologiques des AGPI

#### I.3.3.1 Régulation synaptique

##### a. Neurotransmission

La synapse est un lieu de transmission de l'influx nerveux, composé de 2 parties. Une terminaison pré-synaptique où le neurotransmetteur est stocké dans des vésicules puis libéré et une terminaison post-synaptique où des récepteurs au neurotransmetteur sont présents. Plusieurs études ont permis d'observer des modifications liées à l'apport alimentaire en AGPI n-3 des processus de neurotransmission impliquant les monoamines (dopamine, sérotonine) et l'acétylcholine (ACh). Ces perturbations ont lieu au niveau du transport et du stockage (vésicules) de ces neurotransmetteurs. Dans le noyau accumbens les récepteurs de la dopamine D2 sont augmentés chez les rats déficients en AGPI n-3 mais diminués dans le cortex frontal. De plus, le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT<sub>2</sub>) est diminué dans ces 2 zones cérébrales (Delion *et al.*, 1994, 1996 ; Zimmer *et al.*, 2000 ; Chalon, 2006). En ce qui concerne la neurotransmission sérotoninergique, il a été montré que la libération basale de sérotonine (5-HT) est augmentée dans l'hippocampe des rats déficients, tandis que la libération déclenchée par une stimulation chimique est diminuée (Kodas *et al.*, 2004 ; Chalon, 2006). D'autre part, la répartition des récepteurs à la 5-HT est perturbée avec l'augmentation de la densité des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> dans le cortex frontal chez les déficients (Delion *et al.*, 1994 ; Chalon, 2006). Il a également été montré que la libération basale d'ACh au niveau de l'hippocampe est plus élevée (+72%) que chez les animaux contrôle alors que la libération induite par le KCl est plus faible (-34%). La déficience provoque une diminution de l'expression des récepteurs muscariniques, sans que l'activité de l'acétylcholine estérase et la quantité des transporteurs vésiculaires de l'ACh soient modifiées (Aïd *et al.*, 2003). En revanche, la supplémentation du régime en DHA supprime les perturbations de la transmission ACh induites par la déficience (Aïd *et al.*, 2005).

##### b. Régulation par l'astrocyte

L'astrocyte joue un rôle important dans le fonctionnement de la synapse. Ces cellules forment un réseau dont les cellules sont reliées par des jonctions communicantes (GAP

jonction) qui permettent le passage rapide de petites molécules entre les astrocytes. Par ailleurs, il permet la recapture du glutamate libéré dans la synapse, *via* les transporteurs GLT1 et GLAST, afin de protéger le neurone de l'effet d'excitotoxicité de ce neurotransmetteur. Dans le complexe synaptique, les AGPI peuvent intervenir lors d'une activation dépolarisante. Le neurotransmetteur libéré, en se liant aux récepteurs, agira indirectement sur la libération des AGPI *via* notamment l'activation de la phospholipase A2. La PLA<sub>2</sub> libère les AGPI estérifiés en position sn-2, principalement l'AA qui peut entrer dans la voie de synthèse de la prostaglandine E2 dont les modes d'action sont multiples, en particulier sur les récepteurs et transporteurs neuronaux et astrocytaires, sur la propagation des vagues calciques et sur la vasodilatation des capillaires cérébraux (revue de Alessandri *et al.*, 2004). Des données récentes impliqueraient aussi le DHA dans la régulation synaptique. L'ajout de DHA au milieu de culture d'astrocytes ou à une suspension cellulaire cérébrale diminue la capture du D-[<sup>3</sup>H]aspartate, analogue non métabolisable du glutamate. Cependant l'expression et la localisation des transporteurs astrocytaires, GLT1 et GLAST, ne sembleraient pas modifiées par l'ajout de DHA ou d'AA (Grintal *et al.*, 2009).

Par ailleurs, le DHA favorise *in vitro* la communication entre astrocytes (Champeil-Potokar *et al.*, 2006). Il a également été montré que le DHA augmente la résistance à la toxicité du glutamate (Wang *et al.*, 2003), protège contre la mort neuronale induite par le kaïnate ou l'ischémie (Lauritzen *et al.*, 2000), favorise la survie neuronale (Hogyes *et al.*, 2003 ; Cao *et al.*, 2005). La réduction décrite de l'activité Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (Bourre *et al.*, 1989) et Ca<sup>++</sup> ATPase (Kearns et Haag, 2002) est aussi à prendre en compte dans la compréhension du rôle joué par les AGPI au niveau synaptique.

#### 1.3.3.2 AGPI et neuroprotection

Des dérivés endopéroxydes du DHA, la neuroprotectine D1 et les neuroprostanes, exercent également des propriétés spécifiques : la neuroprotectine D1 présente notamment des effets anti-inflammatoires en inhibant l'infiltration des leucocytes, et s'oppose au processus d'apoptose en limitant l'expression de facteurs pro-apoptotiques induite par un stress oxydant consécutif à une ischémie cérébrale (Marcheselli *et al.*, 2003). Les neuroprostanes exercent également des effets neuroprotecteurs (Bazan, 2006). Dans des études *in vitro* (co-culture de neurones et de cellules gliales humaines), l'ajout de DHA induit la synthèse de NPD1 et diminue celle des peptides Aβ, qui constituent les plaques

amyloïdiennes, marqueurs de la maladie d'Alzheimer (Lukiw *et al.*, 2005). Les AGPI interviennent dans la synthèse et sur le fonctionnement des cytokines, molécules inflammatoires. Il a été montré que lors d'une diminution du taux de DHA l'expression des cytokines inflammatoires est augmentée (Mingam *et al.*, 2008). La supplémentation en DHA aurait également des effets sur ce processus (Layé, 2010).

#### *1.3.3.3 AGPI et troubles comportementaux*

Un grand nombre d'études ont établi une relation entre l'insuffisance d'apport en n-3 et l'apparition de perturbations comportementales. Les données portent fréquemment sur les tests cognitifs avec lesquels on évalue le nombre d'essais nécessaires pour que l'animal placé en situation de stress réponde par un comportement d'évitement (shuttle box) (Bourre *et al.*, 1989), de choix (discrimination olfactive) (Greiner *et al.*, 1999) ou d'échappement (Piscine de Morris) (Lim *et al.*, 2005). Les performances des animaux déficients soumis à ces tests sont inférieures à celles des animaux contrôles témoignant d'un amoindrissement de leur capacité d'apprentissage.

Dans un autre registre, de nombreux travaux sur le rongeur rendent compte de l'effet des AGPI n-3 sur l'activité motrice de rongeurs (Fedorova et Salem 2006). Il a été observé chez des rats déficients une augmentation de l'activité motrice mesurée par la durée et la longueur de déplacements dans la piscine de Morris (Moriguchi et Salem, 2003), les distances parcourues dans l'openfield (Wainwright, 1994), et le nombre de déplacements latéralisés dans un couloir circulaire (Vancassel *et al.*, 2005). Des études chez les rongeurs ont montré qu'une déficience est associée à une hyperactivité locomotrice (Lavialle *et al.*, 2008, 2010).

Ces données obtenues à partir de modèles animaux sont à rapprocher de ce qui est observé chez des enfants hyperactifs, dont le taux plasmatique en AGPI n-3 est plus bas que la normale. Cependant, les essais cliniques conduisent parfois à des résultats contradictoires et ne permettent pas de prouver un lien direct entre apport en AGPI n-3 et hyperactivité. Des études épidémiologiques ont révélé des anomalies dans la composition en AGPI n-3 chez des patients atteints de troubles de l'humeur (dépression majeure, troubles bipolaires,...) (Freeman *et al.*, 2000) et une protection par la consommation élevée de poisson (riche en AGPI n-3) vis-à-vis de la dépression (Suominen-Taipale *et al.*, 2010). Des études chez l'animal

ont confirmé le lien entre diminution de DHA cérébral et altération du comportement émotionnel (Lavialle *et al.*, 2010 ; Layé *et al.*, 2010).

## **II LE METABOLISME ENERGETIQUE**

Le cerveau est l'organe qui consomme le plus de glucose proportionnellement à son poids. En effet représentant seulement 2% du poids du corps, il consomme 25% du glucose total et 20% de l'oxygène au repos. Sur la base de la différence de concentration artérioveineuse, on estime chez l'Homme la consommation cérébrale de glucose à 31 $\mu$ moles/100g.min. Cette forte consommation est notamment due au besoin important en énergie de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pour rétablir les potentiels de membrane au cours du processus de neurotransmission. Le glucose entre dans la voie de la glycolyse afin de donner du pyruvate, lequel est utilisé dans le cycle de Krebs et la voie de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie. Ceci va conduire à une production importante de molécules d'ATP, utilisées par la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pour assurer au niveau du neurone et de l'astrocyte le rétablissement des gradients ioniques. Il a été estimé que cette pompe utilisait environ la moitié de l'ATP produit *in situ*. En situation d'activation neuronale locale, une stimulation provoque une augmentation de la consommation d'ATP et de l'utilisation cérébrale locale du glucose.

En situation de repos, il existe une relation entre les consommations de glucose et d'oxygène. L'O<sub>2</sub> est complètement utilisé pour l'oxydation du glucose. Mais en situation d'activation, le mécanisme est différent, en effet lors d'un stimulus la consommation de glucose augmente de 15-20% alors que l'augmentation de la consommation en oxygène est seulement de 5%. Il est proposé alors que, dans ce cas, la demande métabolique doit être assurée par une glycolyse anaérobie qui s'affranchit de l'O<sub>2</sub> (Nehlig et Coles, 2007).

### **II.1 Transporteurs du glucose**

Les transporteurs de glucose se composent de 2 grandes familles, l'une réalisant un transport du glucose couplé à celui du sodium (SGLT) et l'autre réalisant un transport facilité du glucose (GLUT). En ce qui concerne le cerveau, les transporteurs présents sont tous indépendants du transport de sodium et sont donc exclusivement de la famille GLUT. Les transporteurs de la famille GLUT se composent de 12 domaines transmembranaires (d'environ 500 acides aminés) avec leurs extrémités N et C-terminales dans le cytoplasme.

L'une des boucles comporte un site glycosylé qui renforce l'ancrage de la protéine dans la membrane plasmique (Wood et Trayhurn, 2003). Les transporteurs GLUT diffèrent par leur affinité et par la cinétique de transport de glucose ( $K_m$  entre 1 et 20mM). Les membres de cette famille sont au nombre de 14, dont 8 sont présents au niveau cérébral : GLUT1-6, GLUT8, GLUT10, GLUT13. Les plus abondants sont les transporteurs GLUT1 et GLUT3. La régulation de l'activité de transport du glucose implique simultanément des modifications de l'expression des transporteurs GLUT et de la translocation du pool intracellulaire vers la membrane plasmique (Zhao et Keating, 2007).

**GLUT1** présente 2 isoformes, issues du même gène, qui diffèrent par la présence ou non de la partie glycosylée et par leur localisation cellulaire. La première isoforme, GLUT1 55kDa, glycosylée sur la boucle 1 extracellulaire, est présente au niveau des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique. GLUT1 45kDa, seconde isoforme non glycosylée, est située sur les prolongements astrocytaires qui enrobent les microvaisseaux cérébraux.

**GLUT3** est un transporteur du glucose situé au niveau des dendrites et axones des neurones dans la plupart des régions cérébrales (cervelet, striatum, cortex, hippocampe) (Nagamatsu *et al.*, 1993 ; Gerhart *et al.*, 1995 ; McCall *et al.*, 1994). Il présente une très forte affinité pour le glucose ( $K_m \approx 1,5\text{mM}$ ). GLUT3 voit son expression augmentée entre le 14<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour postnatal et 90% de l'expression de ce transporteur est atteint au 30<sup>ème</sup> jour de vie chez le rat (Vanucci, 1994).

GLUT2 (forme minoritaire dans le système nerveux central) joue un rôle dans la détection du glucose ("glucose-sensing") dans les cellules  $\beta$  du pancréas et dans le transport bidirectionnel du glucose dans le foie. Les variations du statut énergétique liées à une modification de la prise alimentaire peuvent être détectées par certaines régions cérébrales notamment l'hypothalamus. Il a été montré que certains neurones sont sensibles à la concentration de glucose circulant grâce à la présence de GLUT2 (Arлуison *et al.*, 2004). GLUT2 a été détecté dans le noyau du tractus solitaire, le noyau moteur du vague, le noyau hypothalamique para-ventriculaire, le noyau arqué et l'aire hypothalamique latérale (Thorens, 2001). L'analyse en microscopie électronique de la localisation cellulaire de GLUT2

dans ces régions met en évidence une présence circonscrite aux seuls astrocytes (Leloup *et al.*, 1994).

GLUT4, présent dans des neurones de l'hypothalamus, est associé aux récepteurs de l'insuline. Un pool cytoplasmique de GLUT4 a été mis en évidence dans les neurones (El Messari *et al.*, 1998). La co-localisation des récepteurs de l'insuline avec ce transporteur a conduit l'équipe de Vannucci (Vannucci *et al.*, 1998) à suggérer que l'insuline déclenche le déplacement de GLUT4 depuis le pool cytoplasmique vers la membrane plasmique.

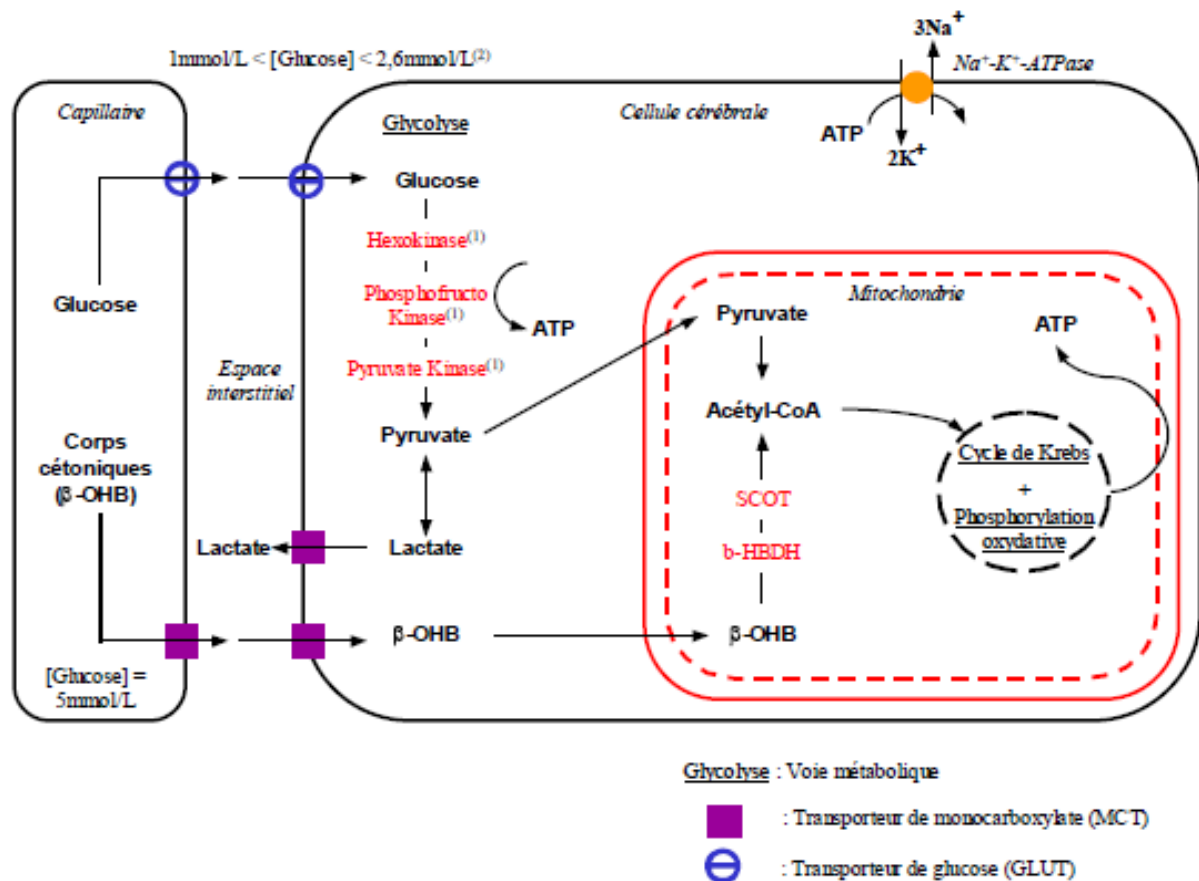
GLUT5 présente une forte affinité pour le fructose, il est surtout exprimé dans les cellules épithéliales intestinales et plus faiblement dans le cerveau. GLUT8, protéine de 51,5kDa, a été mise en évidence dans l'hippocampe.

## **II.2 Transporteurs des Monocarboxylates (MCT)**

Le cerveau peut utiliser d'autres substrats énergétiques que le glucose, notamment dans des périodes particulières telles que le développement postnatal associé à une alimentation lactée hyperlipidique, lors d'une période de jeûne ou en cas d'hypoglycémie. Dans ces différents cas de diminution de la glycémie, le cerveau peut utiliser des substrats énergétiques alternatifs, les corps cétoniques. Parmi ces derniers, le  $\beta$  hydroxybutyrate, l'acétoacétate et l'acétone, synthétisés et sécrétés par le foie, sont les principaux substrats utilisables par le cerveau. Ces molécules, qui font partie de la famille des monocarboxylates, sont capables de traverser la barrière hémato encéphalique (BHE) et les membranes des cellules nerveuses *via* des transporteurs spécifiques, les MonoCarboxylates Transporters (MCT) (Magistretti et Pellerin, 2005). La dégradation des monocarboxylates s'effectue dans la mitochondrie et aboutie à la formation d'acétyl-CoA en quantité plus importante que celle obtenue à partir du métabolisme glucidique (Figure 9, d'après Seyfried et Mukherjee, 2005). Les transporteurs de la famille MCT sont également reconnus par d'autres monocarboxylates comme par exemple le lactate et le pyruvate. La famille des transporteurs MCT comporte 14 membres présents dans différents tissus. Au niveau du système nerveux central, 3 isoformes majoritaires sont présentes : MCT1, 2 et 4. **MCT1** est exprimé dans les cellules endothéliales des microvaisseaux et les astrocytes, **MCT2** dans les neurones et **MCT4** uniquement dans les astrocytes.

Chez l'Homme et les rongeurs, les transporteurs GLUT et MCT voient leur mode d'expression évoluer de façon différente au cours de la période de développement. On peut ainsi observer au cours du développement un changement de substrat énergétique utilisé





**Figure 9 : Principales voies de l'utilisation des substrats énergétiques par le cerveau (adapté d'après Seyfried et Mukherjee, 2005).**

<sup>1</sup>Enzymes limitantes de la glycolyse

<sup>2</sup>La concentration extracellulaire de glucose dépend de la zone cérébrale étudiée, de l'espèce et de la méthode employée pour la mesure

<sup>3</sup>Les corps cétoniques regroupent le β-hydroxybutyrate (β-OHB), l'acétoacétate et l'acétone.

Le β-hydroxybutyrate est quantitativement le plus important dans la circulation, et l'acétone est un co-produit non-enzymatique de la synthèse des corps cétoniques qui est éliminé par voies urinaire et pulmonaire. La dégradation du β-hydroxybutyrate en acétoacétate puis en acétyl-CoA fait intervenir trois enzymes : la 3-β-hydroxybutyrate déshydrogénase (β-HBDH), la succinyl-CoA acétoacétate-CoA transférase (SCOT) et enfin l'acétyl-CoA thiolase.

par le cerveau. En effet chez le rongeur, l'expression de MCT1 est plus abondante que celle de GLUT1 jusqu'à l'âge postnatal de 14 jours, puis la proportion des deux transporteurs s'inverse à partir de J27 (Vannucci et Simpson, 2003).

### **II.3 Les étapes du métabolisme énergétique**

Le métabolisme énergétique reposant sur l'utilisation du glucose comme substrat préférentiel mobilise différentes voies communes à la plupart des tissus : le transport membranaire du glucose associé à la glycolyse, la voie du glycogène (synthèse et lyse), le cycle de Krebs (TCA) et la voie de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie ou la voie anaérobie de production du lactate.

#### **II.3.1 La glycolyse**

Le transport du glucose par les transporteurs GLUT (cf. paragraphe II.1) est associé à la glycolyse, permettant de produire de l'ATP et des molécules carbonées utilisables par les autres voies métaboliques. Elle comporte 10 étapes successives qui au final conduisent à la formation de 2 molécules de pyruvate et d'ATP à partir d'une molécule de glucose (Figure 10). Elle se déroule dans le cytosol de la cellule.

La glycolyse peut se décomposer en 2 grandes phases :

- La phase de consommation d'ATP lors de laquelle les hexoses sont phosphorylés puis transformés en glycéraldéhyde-3-phosphate.
- La phase de production d'ATP, commune à tous les hexoses et qui conduit suite à l'oxydation du glycéraldéhyde-3-phosphate à la formation de pyruvate, d'ATP et du NADH, H<sup>+</sup>.

#### ***Etapas de la première phase***

La première étape, catalysée par l'hexokinase (Hk), permet la phosphorylation du glucose (glc) en glucose-6-phosphate (glc-6-P), elle est irréversible et limitante. Le glc-6-P peut exercer un rétrocontrôle négatif sur cette enzyme. Puis le glc-6-P subit une isomérisation, réaction réversible, afin de donner le fructo-6-phosphate (fru-6-P) *via* la

**phosphoglucoisomérase** (pgi). La troisième étape conduit à la formation du fructose 1,6-bisphosphate (fru-1,6-biP) par la **phosphofructokinase1** (pfk1), enzyme allostérique qui est

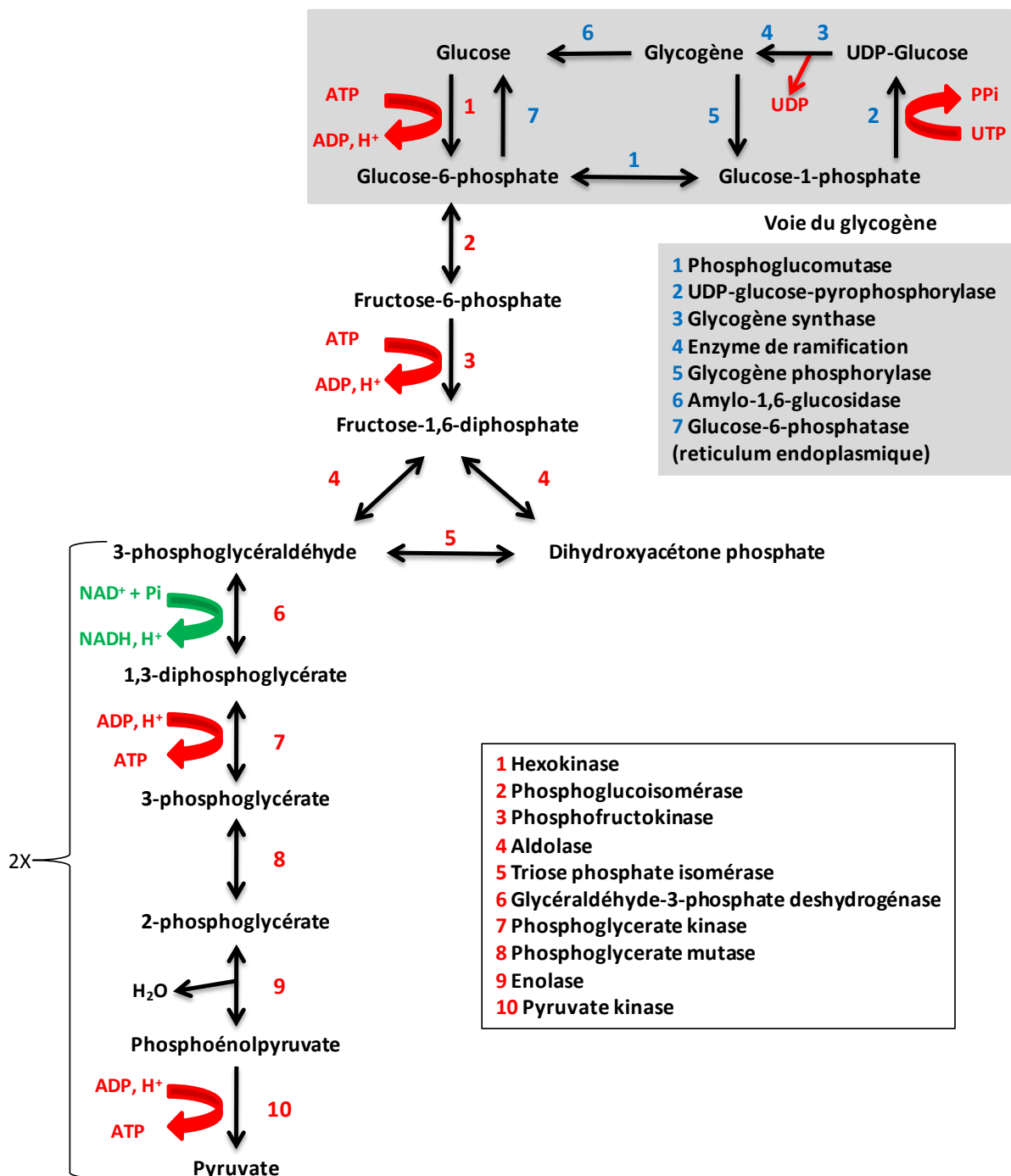
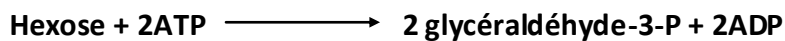


Figure 10 : La glycolyse - Etapes, enzymes, cofacteurs.

inhibée par de forte concentration d'ATP. Cette réaction est irréversible et nécessite la présence d'ions  $Mg^{2+}$ . Ensuite le fru-1,6-biP est clivé par l'enzyme fructose 1,6-biP aldolase pour donner le glycéraldéhyde-3-P (G-3-P) et le dihydroxyacétone-3-P. Ce dernier composé va être converti en glycéraldéhyde-3-P (étape d'interconversion des trioses-P), seul composé utilisé dans la suite de la glycolyse. A la fin de cette première phase de la glycolyse tous les hexoses sont catabolisés selon la réaction globale suivante :



### ***Etapas de la seconde phase***

Chaque molécule de glycéraldéhyde-3-P obtenue dans la première phase va subir une série de réactions pour conduire à la formation du pyruvate.

La première étape de cette phase consiste en une oxydation du G-3-P en 3-phosphoglyceroyl-1-P par la **3-phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase**. Cette réaction réversible exige la présence du phosphate minéral ( $P_i$ ) et libère des électrons qui seront pris en charge par le  $NAD^+$ . Le groupement phosphate est transféré sur l'ADP par la **3-phosphoglycérate kinase**, ce qui permet la formation d'un ATP et du 3-phosphoglycérate (3-PG). Le phosphate du 3-PG est ensuite déplacé en position 2 par la **phosphoglycérate mutase** en présence de  $Mg^{2+}$ , le produit ainsi obtenu est le 2-phosphoglycérate. Une molécule d'eau en est extraite par l'**enolase**, ce qui provoque un réarrangement électronique conduisant à la formation du phosphoénolpyruvate, molécule la plus riche en énergie fabriquée par la cellule. L'étape qui termine la glycolyse est le transfert du phosphate sur l'ADP. Cette réaction irréversible est catalysée par la **pyruvate kinase** qui nécessite la présence des ions  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ . Cette dernière étape conduit à la formation du pyruvate et de l'ATP.

### ***La glycolyse anaérobie***

Les étapes sont les mêmes que pour la glycolyse aérobie mais le pyruvate produit est réduit en lactate dans le cytosol par la **lactate-déshydrogénase** (LDH) en présence de NADH,  $H^+$ . Le lactate produit sera utilisé notamment dans la néoglucogenèse lactique qui permet de fournir du glucose dans certaines situations (jeûne, effort physique).

### II.3.2 La voie du glycogène (Figure 10, encadré gris)

#### ***Glycogénogenèse***

Cette voie permet de stocker dans le cytoplasme le glucose sous forme de glycogène. Cette synthèse a lieu dans tous les tissus mais plus particulièrement dans le foie et les muscles. Il est synthétisé à partir du glucose-6-phosphate suivi de 4 réactions dont 3 sont irréversibles. Le glucose-6-phosphate est d'abord isomérisé en glucose-1-phosphate (Glc-1-P) par la P-Glucomutase. Le Glc-1-P est ensuite activé en UDP-Glucose par l'UDP-glucose-pyrophosphorylase en présence d'UTP. Puis la glycogène synthase ajoute successivement les UDP-glucose sur la chaîne linéaire de glycogène en croissance. Lorsque cette chaîne compte environ 20 unités de glucose, une enzyme de ramification transfère 5 à 8 molécules d'UDP-glucose sur le 6<sup>ème</sup> carbone d'un glucose de la chaîne de glycogène. Cette dernière étape permet à la glycogène synthase de continuer son action d'élongation.

La synthèse du glycogène comporte 2 points de régulation : l'hexokinase et la glycogène synthase, 2<sup>ème</sup> enzyme clé de cette voie. Cette dernière est soumise à un processus de phosphorylations (forme inactive) - déphosphorylations (forme active). La conversion en forme active a lieu lorsque la glycémie et l'insulinémie sont élevées. Dans le muscle au repos, la conversion est déclenchée par de faibles taux de  $\text{Ca}^{++}$  et AMP intracellulaires.

#### ***Glycogénolyse***

La dégradation du glycogène fournit du glucose endogène et permet de répondre temporairement aux besoins énergétiques des tissus. Suite à une période de jeûne, le foie mobilise ses réserves de glycogène afin de libérer du glucose dans le sang. Le muscle dégrade le glycogène en glucose-6-phosphate et peut ainsi couvrir ses besoins en glucose pendant quelques jours. En cas d'effort physique intense le glucose-6-phosphate est rapidement mis à disposition. Ce processus de dégradation du glycogène a lieu dans le cytosol sauf pour la réaction d'hydrolyse du glucose-6-phosphate en glucose qui a lieu dans le réticulum endoplasmique des cellules hépatiques. La structure ramifiée du glycogène permet la libération rapide de glucose-6-phosphate grâce à 3 réactions. La glycogène

phosphorylase libère les unités de glucose sous la forme de glucose-1-phosphate. En parallèle, après le transfert de 4 unités de glucose sur une autre chaîne, l'amylo-1,6-glucosidase (qui intervient au niveau des points de ramification) libère une unité de glucose de sorte que la chaîne linéaire reste accessible à la glycogène phosphorylase. Le glucose-1-phosphate est finalement transformé en glucose-6-phosphate par la phosphoglucomutase.

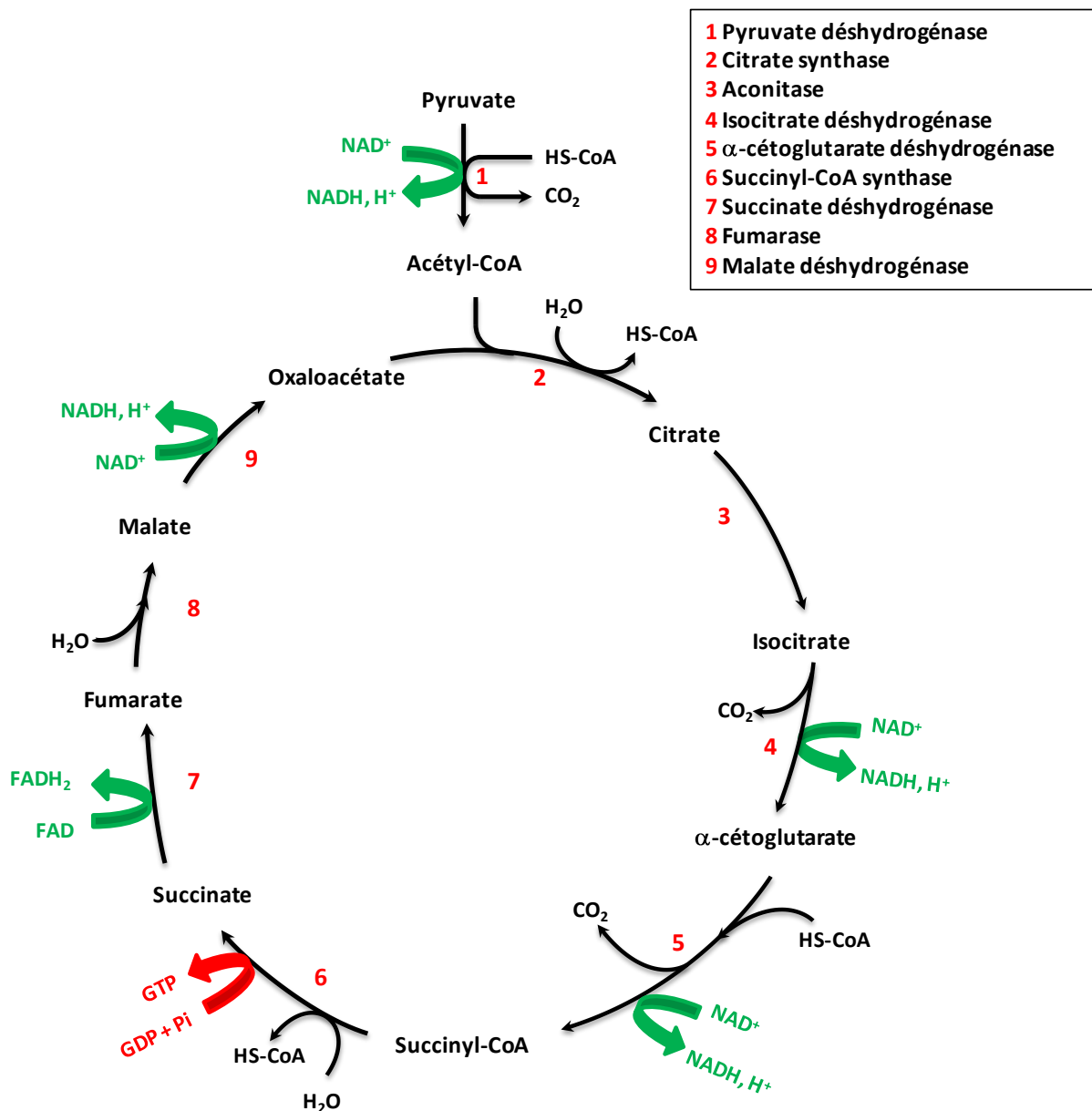
La régulation de la glycogénolyse se fait *via* la glycogène-phosphorylase par un mécanisme de phosphorylation-déphosphorylation. La conversion de la forme inactive déphosphorylée en forme active est réalisée par une cascade de protéines kinases préalablement activées par le glucagon. La réaction inverse d'inactivation est réalisée par la protéine-phosphatase1 dont l'activité dépend de l'élévation de l'insulinémie, laquelle est déclenchée par la prise d'aliments.

### II.3.3 Le cycle de Krebs (ou le cycle des acides tricarboxyliques)

Le cycle de Krebs est une suite de réactions localisées dans la matrice mitochondriale, qui conduisent en présence d'oxygène à la formation d'intermédiaires énergétiques servant à la production d'ATP *via* la chaîne respiratoire (Figure 11). Il est le point de convergence de plusieurs voies cataboliques (glucides, lipides et acides aminés). La pyruvate déshydrogénase (**pdh**) est l'une des enzymes du complexe pyruvate-déshydrogénase composé d'une décarboxylase (la *pdh*), d'une acétyltransférase et d'une oxydoréductase faisant la jonction entre la glycolyse et le cycle de Krebs. Ces 3 enzymes du complexe vont intervenir successivement afin de catalyser la décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA qui alimente le cycle de Krebs. La première étape du cycle consiste en la condensation de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate produisant le citrate. En fin de cycle on aboutit à la formation d'une nouvelle molécule d'oxaloacétate qui va réagir avec une autre molécule d'acétyl-CoA issue du métabolisme cellulaire. Au cours d'un tour de cycle, 2 molécules de CO<sub>2</sub> se dégagent et 3 molécules de NADH et une de FADH<sub>2</sub> sont formées. Ces molécules énergétiques vont être ensuite utilisées par la voie de phosphorylation oxydative pour engendrer 11 molécules d'ATP.

Certaines étapes de ce cycle, irréversibles, peuvent être régulées. La citrate synthase (**Cs**) (étape 2) est activée par l'ADP et inhibée par le NADH, l'ATP et le citrate. L'isocitrate déshydrogénase, **ldh**, (4) et l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase (5) sont activées par le

calcium et l'ADP mais inhibée par le NADH et l'ATP. L' $\alpha$ -cétooglutarate est en plus inhibée par le produit de son activité, le succinyl-CoA.



**Figure 11 : Les différentes étapes du Cycle de Krebs.**  $\text{NAD}^+$  : Nicotine Adénine Dinucléotide ;  $\text{FAD}$  : Flavine Adénine Dinucléotide ;  $\text{GDP}$  : Guanosine 5'-DiPhosphate ;  $\text{GTP}$  : Guanosine 5'-TriPhosphate ;  $\text{HS-CoA}$  : Coenzyme A ;  $\text{Pi}$  : Phosphate minéral. **2 : Condensation** Acétyl-CoA et Oxaloacétate en Citrate ; **3 : Isomérisation** du citrate en isocitrate ; **4 : Déshydrogénation et  $\beta$ -décarboxylation** ; **5 :  $\alpha$ -décarboxylation oxydative** ; **6 : Transphosphorylation** ; **7 : Déshydrogénation** ; **8 : Hydratation** ; **9 : Déshydrogénation**.

### II.3.4 La phosphorylation oxydative (chaîne respiratoire)

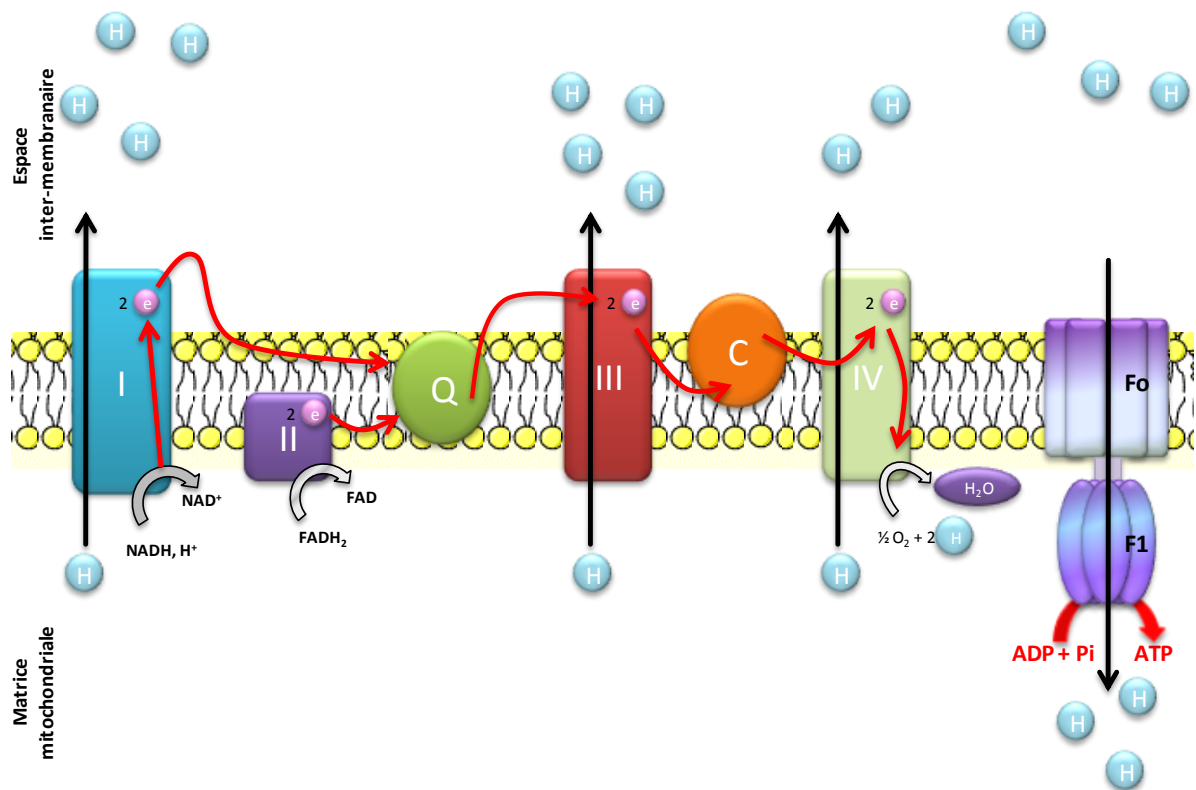
La chaîne respiratoire se déroule au niveau des crêtes de la mitochondrie. Elle se compose de 5 complexes multi-enzymatiques associés avec des cofacteurs qui permettent l'oxydation du NADH et de l'ubiquinone (CoQ) qui ont été produits par le cycle de Krebs. Les 4 premiers complexes (NADH-ubiquinone réductase, Succinate-ubiquinone réductase, Ubiquinone-cytochrome C réductase, Cytochrome oxydase) interviennent dans le transfert d'électrons. Ce processus de retour à l'état oxydé est couplé à la formation d'un gradient de protons dont la dissipation par l'ATP synthase (complexe V) permettra la phosphorylation de l'ADP en ATP. Tout au long de la voie de phosphorylation oxydative les électrons provenant du NADH et du  $\text{FADH}_2$  cèdent de l'énergie permettant la formation du gradient de protons entre l'espace inter-membranaire et la matrice de la mitochondrie. Les électrons sont transportés *via* les différents complexes qui composent cette chaîne respiratoire (Figure 12).

Le complexe I a une activité de NADH coenzyme Q réductase (**Ndufa**), acceptant les électrons du NADH et permettant le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale dans l'espace inter-membranaire. Le complexe II présente une activité de Succinate coenzyme Q réductase (**Sdh**), acceptant les électrons du  $\text{FADH}_2$  sans transport de protons. Le complexe III a une action Coenzyme Q cytochrome C réductase (**Uqcrc**), permettant le transport de 4 protons. Le complexe IV possède une activité de Cytochrome C oxydase (**Cox**), et permet le transport de 2 protons. Le coenzyme Q (ou ubiquinone) permet la transition entre le complexe I ou II et le complexe III. Il accepte également les électrons provenant du cytosol. Le cytochrome C permet la transition entre le complexe III et le complexe IV.

Le complexe V, ATP synthétase, est une pompe ionique inversée. En effet, elle produit l'ATP grâce au passage des protons dans le sens du gradient. Elle se compose de 2 sous unités : F0 est intra-membranaire et joue le rôle de canal protonique, et F1 qui se situe dans la matrice. C'est cette dernière qui possède l'activité ATP-synthétase. De plus ce complexe possède un segment statique qui stabilise la structure du complexe.

Le NADH permet ainsi le transport de 10 protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire, tandis que le  $\text{FADH}_2$  en prend 6 en charge. Grâce à l'ATP synthétase, le





**Figure 12 : Les complexes de la voie de Phosphorylation Oxydative (chaîne respiratoire).**

Cette voie correspond à une série de complexes protéiques situés au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, responsables de la production d'ATP à partir du NADH et du FADH<sub>2</sub> qui eux sont produits lors des différents catabolismes de la cellule. **Complexe I, NADH coenzyme Q réductase**, récupère les électrons (e<sup>-</sup>) du NADH et transporte 4 protons (H<sup>+</sup>) de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire. **Complexe II, Succinate coenzyme Q réductase**, récupère e<sup>-</sup> du FADH<sub>2</sub>. **Complexe III, Coenzyme Q cytochrome c réductase**, transporte 4H<sup>+</sup> de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire. **Complexe IV, Cytochrome c oxydase**, transporte 2H<sup>+</sup>. **Coenzyme Q (Q)** permet la transition entre le complexe I ou II et le complexe III. **Cytochrome C (C)** permet la transition entre le complexe III et IV. **ATP-synthétase**, pompe à protons, formée de 2 sous unités F<sub>0</sub> et F<sub>1</sub> (catalytique), est à l'origine de la production d'ATP.

gradient de protons formé permet la production théorique de 3 ATP à partir des 10 protons transportés par le NADH et de 2 ATP pour le FADH<sub>2</sub>.

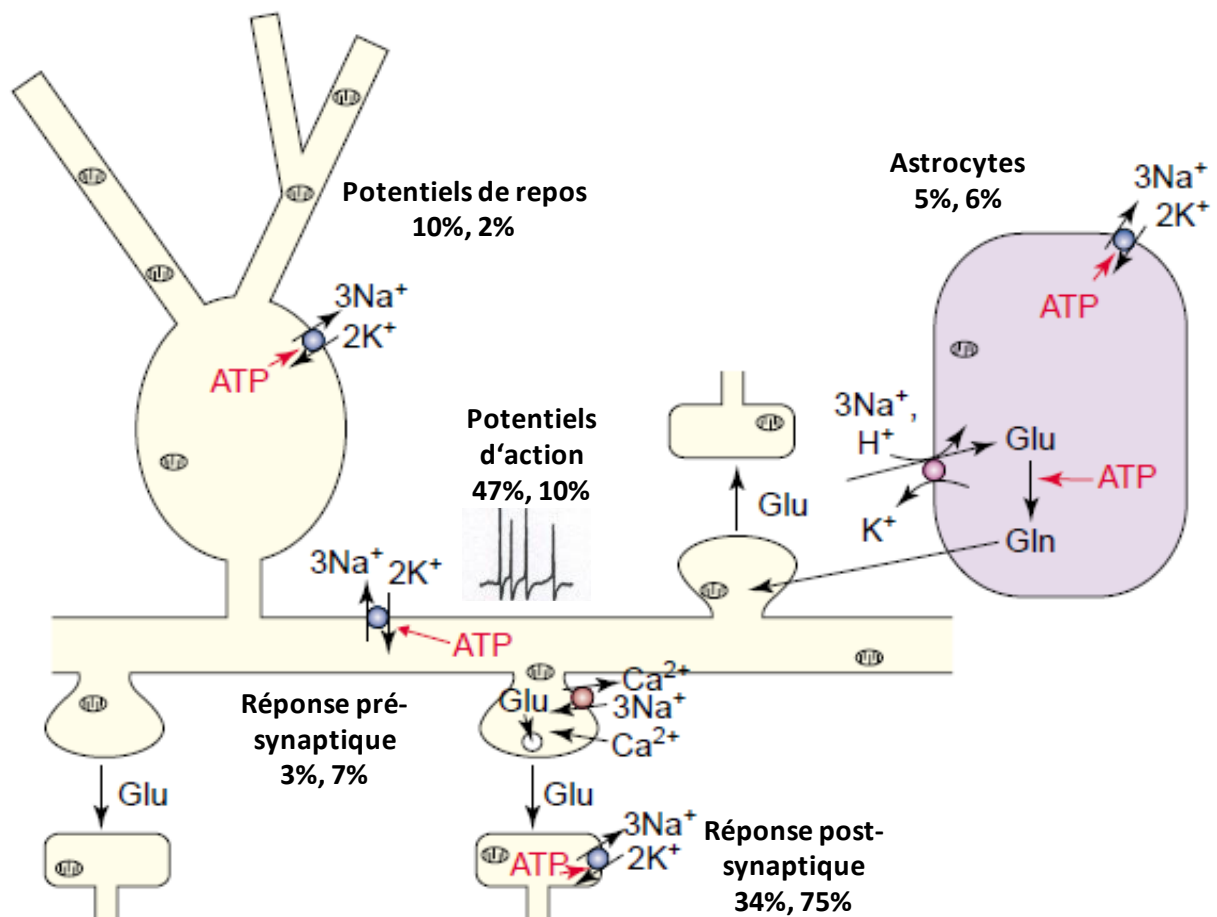
## **II.4 Métabolisme énergétique cérébral**

En situation de repos, le métabolisme énergétique du cerveau est assuré par un flux constant de glucose venant de la circulation sanguine (environ 5g/h chez un homme adulte). En situation d'activation neuronale, l'ATP généré par l'oxydation du glucose est alors majoritairement utilisée pour couvrir les besoins énergétiques nécessaires au rétablissement du potentiel de membrane après le passage du potentiel d'action impliquant l'activation de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (Atwell, 2002). Il a été estimé que cette dernière pouvait consommer 50% de l'ATP produit par le neurone. Pour assurer le fonctionnement de la synapse glutamatergique, la libération du glutamate et sa capture par l'astrocyte (processus de recyclage) constituent un processus supplémentaire coûteux en énergie (Sibson *et al.*, 1998). Un schéma de la répartition de la consommation énergétique (Figure 13), proposé par Atwell et Iadecola (2002) a mis en avant des niveaux de consommation qui varient en fonction de l'espèce (rongeurs et primates). Chez les rongeurs les étapes les plus fortement consommatrices d'énergie sont celles qui permettent d'assurer le potentiel d'action et la réponse post-synaptique au niveau des synapses excitatrices, soit 47 et 34% respectivement. Le reste de l'énergie est utilisé pour répondre au métabolisme énergétique propre à l'astrocyte (5%), le maintien des potentiels de repos (10%) et pour la réponse pré-synaptique (3%). Pour les primates, la partie la plus consommatrice d'énergie est la réponse post-synaptique (environ 75%), ce qui peut être expliqué par la proportion de synapses par neurone dix fois plus importante que chez les rongeurs. Seulement 10% de l'énergie totale est utilisée pour couvrir les potentiels d'action (Figure 13).

### **II.4.1 Les acteurs principaux du métabolisme énergétique**

Trois acteurs cellulaires sont impliqués dans le métabolisme énergétique cérébral : le neurone, principal consommateur d'énergie du système nerveux central notamment pour rétablir les potentiels de membranes lors d'une activation, l'astrocyte qui participe au recyclage des neurotransmetteurs comme le glutamate mais également à la fourniture de substrats énergétiques alternatifs au neurone, et la cellule endothéliale, lieu de la régulation





**Figure 13 : Répartition de la consommation d'énergie lors d'une activation neuronale** (d'après Atwell et Iadecola, 2002). Les valeurs sont exprimées en % de l'énergie totale utilisée lors de la neurotransmission. Le couple de valeurs correspond à une estimation chez les rongeurs et chez les primates, respectivement.

de l'entrée du glucose circulant dans le cerveau. Autour de ces 3 partenaires, plusieurs mécanismes de couplage cellulaire entre activité neuronale et utilisation du glucose ont été proposés (Leybaert, 2005). Le couplage neuro-vasculaire, qui associe la variation d'activité neuronale à la dilatation des vaisseaux et donc au débit sanguin. L'astrocyte joue un rôle vasorégulateur dans ce couplage en libérant des molécules vasodilatatrices ou vasoconstrictrices et permet ainsi d'augmenter les apports en glucose et oxygène au neurone (Harder *et al.*, 1998 ; Iadecola, 1993; Kuschinsky, 1997; Lou *et al.*, 1987; Villringer *et* Dirnagl, 1995; Wahl *et* Shilling, 1993). Ce couplage est associé à un second couplage neuro-vasculaire dénommé neurone-barrière («neurobarrier coupling») qui consiste à adapter spécifiquement au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) la vitesse de transport du glucose à la demande énergétique en modulant la quantité et/ou l'activité des transporteurs GLUT1. En effet, si en situation basale le taux de transport du glucose n'est pas considéré comme étant le facteur limitant, ce n'est pas le cas en situation d'activation neuronale car le passage du glucose à travers la BHE peut devenir une étape limitante. Enfin, le couplage neuro-métabolique associe l'activité neuronale et le métabolisme énergétique de l'astrocyte (Pellerin *et* Magistretti, 1994). Ce mécanisme a été proposé pour les synapses glutamatergiques et repose sur l'hypothèse selon laquelle, en situation d'activation, l'astrocyte pourrait fournir au neurone un substrat énergétique alternatif au glucose, le lactate. En effet, dans cette situation le neurone est incapable d'augmenter sa consommation de glucose pour satisfaire la demande d'énergie supplémentaire. Le lactate constituerait un substrat de compensation, qui serait spécifiquement produit dans l'astrocyte par glycolyse anaérobie. Dans ce modèle, l'augmentation de la consommation de glucose serait assurée en amont par une élévation du taux de captage du glucose par les astrocytes *via* la cellule endothéliale.

#### **II.4.2 Couplage neuro-métabolique, modèle « Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle » (d'après Pellerin *et* Magistretti, 1994)**

Ce modèle de couplage neuro-métabolique a été établi suite à un ensemble de résultats obtenus *in vitro*. Ce couplage fait intervenir le concept de synapse tri-partite (neurones pré et post synaptique et astrocyte) ainsi que la cellule endothéliale. Selon le modèle proposé par Pellerin *et* Magistretti pour une synapse glutamatergique (la plus répandue dans le SNC) (Figure 14), un changement de potentiel d'action est observé lors

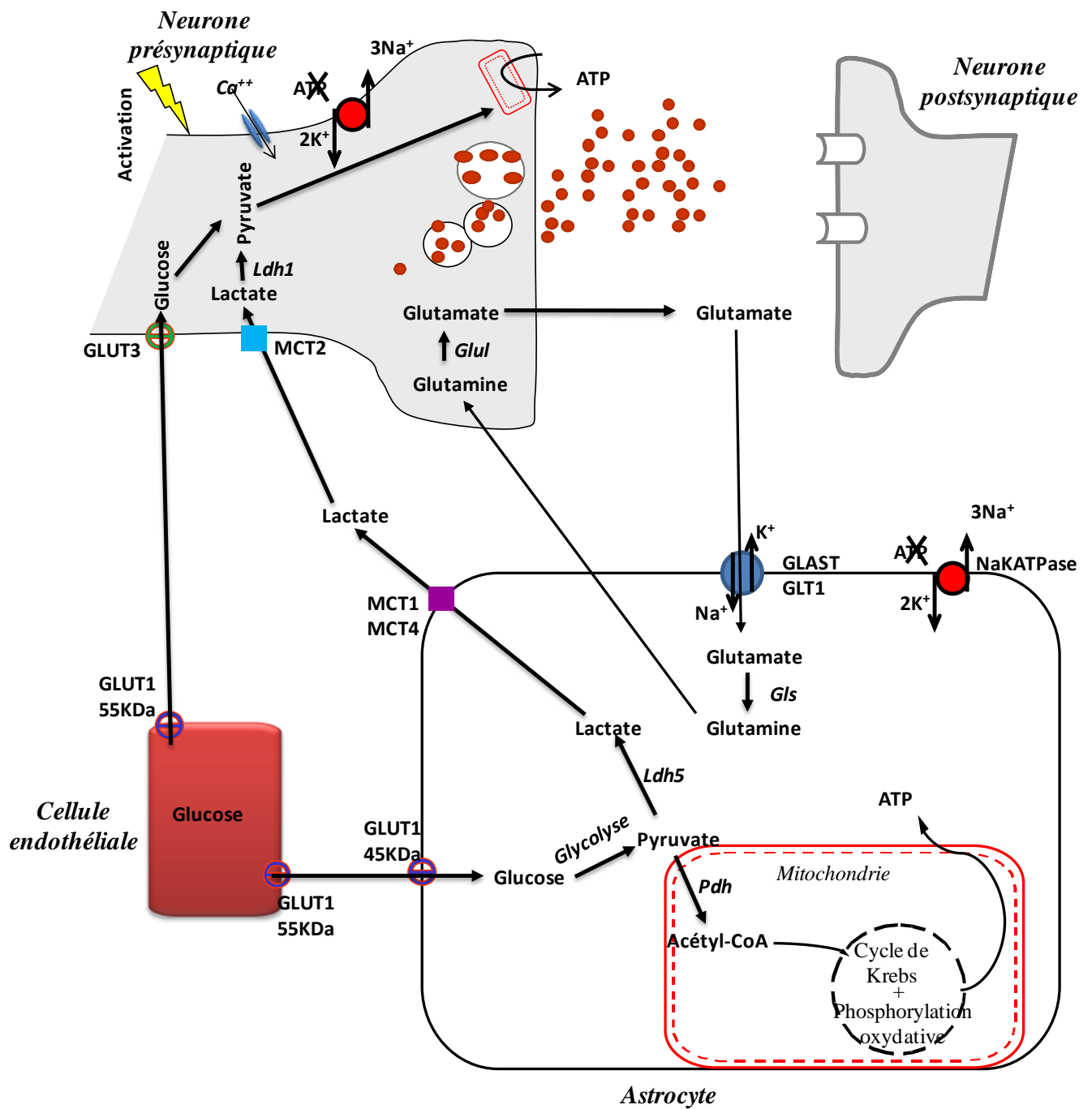


Figure 14 : Couplage neuro-métabolique, modèle "Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle"

d'après Pellerin et Magistretti, 1994.

d'une activation neuronale. Ce potentiel d'action se propage le long de l'axone jusqu'à la terminaison présynaptique du neurone. A ce niveau, la dépolarisation entraîne plusieurs mécanismes dont l'entrée de calcium. Ce flux calcique représente un signal pour les vésicules contenant le glutamate : elles fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent ainsi le glutamate dans la fente synaptique. Le glutamate libéré active les récepteurs postsynaptiques, ce qui constitue la première étape de l'intégration postsynaptique. En parallèle, le glutamate est capté par l'astrocyte par les transporteurs **GLAST** et **GLT1** pour protéger la synapse d'un processus d'excitotoxicité. Ce transport est associé à une entrée d'ions sodium qui déclenche l'activité de la pompe **Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase**, laquelle est très consommatrice d'énergie, pour expulser l'excès d'ions sodium intracellulaire. Afin d'alimenter la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, l'astrocyte produit du pyruvate à partir du glucose de la circulation et l'acétyl-CoA généré par le pyruvate produit de l'ATP *via* la chaîne respiratoire. L'astrocyte peut également former le lactate à partir du pyruvate *via* la glycolyse anaérobie. Des études *in vitro* ont montré que les astrocytes ont la capacité de produire et sécréter du lactate, processus qui s'accompagne d'une augmentation très rapide (quelques minutes) de l'utilisation du glucose (Pellerin et Magistretti, 1994 ; Loaiza *et al.*, 2003). Des transporteurs de lactate sont présents à la surface des astrocytes mais également des neurones. Ces transporteurs appartiennent à la famille des MCT représentée par les isoformes **MCT1** et **MCT4** au niveau de l'astrocyte et **MCT2** au niveau neuronal (Magistretti et Pellerin, 2005). Dans le neurone, le lactate est converti en pyruvate par une isoforme neuronale de la lactate deshydrogénase (**Ldh1**). Dans l'astrocyte, le glutamate est métabolisé en glutamine par la glutamine synthase (**Gls**), qui sera restitué au neurone par une réaction inverse catalysée par la glutaminase (**Glu1**), permettant ainsi la restauration du pool pré-synaptique de glutamate neuronal. Si l'activation est prolongée, les stocks de glycogène astrocytaire réalimentent ce cycle en glucose et assurent le maintien de l'activité de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase. Les astrocytes par leur organisation en réseau et leurs mécanismes d'action divers représentent un pilier dans le métabolisme énergétique. En effet, les vagues calciques se propagent dans le réseau astrocytaire en passant par les jonctions communicantes et ainsi les astrocytes vont pouvoir moduler l'activité neuronale à distance en libérant du glutamate, de l'ATP, de la D-sérine (Halassa *et al.*, 2006 ; Halassa et Haydon, 2010).

### III ETAT DE LA QUESTION : RECHERCHE DES CIBLES D’ACTION DES AGPI EN CONSIDERANT DIFFERENTES ETAPES DU METABOLISME ENERGETIQUE

Des études mettent en évidence un effet des AGPI sur le métabolisme énergétique cérébral. La première observation a été faite au niveau des terminaisons nerveuses de rats carencés qui présentaient une diminution de l’activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Bourre *et al.*, 1989). Par la suite, plusieurs travaux ont montré que l’expression de gènes codants pour différentes sous-unités de la cytochrome c oxydase et de l’ATP synthase était augmentée chez des rats alimentés avec un régime enrichi en EPA et DHA (huile de poisson), ou en 18:3 n-3 (huile de périlla) (Kitajka *et al.*, 2002, Barcelo-Coblijn *et al.*, 2003 ; Kitajka *et al.*, 2004). Un certain nombre de travaux conduits dans notre laboratoire, portant sur différents acteurs et à plusieurs niveaux du métabolisme énergétique, confirment et étayent ces données. Chez des rats adultes carencés en AGPI n-3, le niveau de captage de glucose est diminué d’environ 30% (méthode de 2-DG selon Sokoloff *et al.*, 1977) dans le cortex et l’hippocampe, de façon concourante avec une diminution de 25 à 30% de l’activité de la cytochrome c oxydase (utilisée comme marqueur de la phosphorylation oxydative)(Ximenes *et al.*, 2002). L’expression du transporteur de glucose GLUT1 a été étudiée et la présence de la protéine GLUT1 a été visualisée par immuno-histochimie et mesurée par western blot. Ces travaux ont conclu à une diminution de 30 à 50% de GLUT1 chez les rats carencés en AGPI n-3 (Ximenes *et al.*, 2002 ; Pifferi *et al.*, 2005).



## OBJECTIFS

Les études précédentes indiquent un effet des AGPI n-3 sur la régulation du transport du glucose et son utilisation au niveau cérébral (Ximenes *et al.*, 2002 ; Pifferi *et al.*, 2005) ainsi que sur des éléments clés du métabolisme énergétique tels que les complexes enzymatiques de la voie de phosphorylation oxydative (Ximenes *et al.*, 2002 ; Kitajka *et al.*, 2004) et la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Bersohn et Spitz, 1974 ; Bourre *et al.*, 1989). Plus précisément, l'observation d'une diminution de la consommation de glucose et de l'activité de la phosphorylation oxydative dans différentes zones cérébrales en relation avec une déficience en AGPI n-3 (Ximenes *et al.*, 2002) soulève la question de l'identification des rouages de la « machinerie » énergétique susceptibles d'être ciblés par les AGPI, notamment par le DHA.

L'objectif principal de ce travail de thèse a été de déterminer si l'apport alimentaire en AGPI n-3 influence seulement le transport du glucose ou a aussi un impact sur des acteurs spécifiques du métabolisme énergétique cérébral, lesquels ont été sélectionnés sur la base du modèle neuro-métabolique de Magistretti *et al.* (1994).

Rappelons que le métabolisme énergétique cérébral augmente lors d'une activation neuronale, d'où la nécessité d'assurer un apport énergétique adapté. Afin de reproduire cette activation neuronale, nous avons placé de jeunes rats adultes dans un environnement enrichi qui stimule des zones cérébrales spécifiques (cortex fronto-pariétal et hippocampe). Nous avons étudié l'impact d'un apport en AGPI n-3 sur le métabolisme énergétique en comparant l'expression de gènes clés de ce métabolisme chez des rats au repos ou soumis à l'environnement enrichi.

Pour aborder la question, deux approches ont été conduites en parallèle : une approche *in vivo* et une approche *in vitro*.

L'approche *in vivo* a été menée sur un modèle de rat adulte âgé de 8-10 semaines ayant un statut cérébral défini en DHA (équilibré, déficient et supplémenté) (Pifferi *et al.*, 2005, 2007). Les animaux ont reçu depuis leur conception jusqu'au sevrage, *via* l'alimentation maternelle, puis jusqu'à l'âge postnatal de 2 mois, un régime qui était

équilibré en AGPI précurseurs des séries n-6 et n-3, déficient en AGPI n-3 ou supplémenté en AGPI à longue chaîne de la série n-3 (DHA et EPA). Deux groupes expérimentaux ont été comparés : les rats maintenus dans leur cage ou les rats placés dans un environnement enrichi qui induit une activation neuronale stimulant ainsi le métabolisme énergétique.

L'étude *in vivo* s'articule autour de 3 axes :

- 1) Etude en situation de repos des effets des 3 régimes expérimentaux sur l'expression génique et protéique de facteurs clés du métabolisme énergétique impliqués dans les étapes suivantes : le transport du glucose, la glycolyse, le métabolisme du lactate et du glutamate, le cycle de Krebs et la voie de phosphorylation oxydative.
- 2) Etude de l'effet d'une situation d'activation en milieu enrichi sur l'expression de ces facteurs clés.
- 3) Analyse de l'impact d'une déficience en n-3 sur la consommation de glucose par imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positons).

Pour l'approche *in vitro*, le modèle utilisé est la culture primaire d'astrocytes de rats nouveau-nés. L'astrocyte exerce un rôle déterminant dans la fourniture énergétique au neurone et le contrôle de l'activité de la synapse glutamatergique à travers 2 fonctions majeures : la régulation de la concentration synaptique du glutamate pour éviter son accumulation excitotoxique pour le neurone, et la production d'un substrat énergétique alternatif au glucose pour le neurone, le lactate (Pellerin et Magistretti, 2007). L'entrée de glutamate dans l'astrocyte est couplée à une entrée de  $\text{Na}^+$  et provoque ainsi une augmentation de l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase et donc de l'utilisation d'ATP. Ce processus stimule alors l'utilisation de glucose par ces cellules permettant la production d'ATP par la voie de la glycolyse mais également la synthèse de lactate à partir du pyruvate. Les études menées au laboratoire sur cette cellule ont montré les effets du DHA sur différentes fonctions dont sa capacité à capter le glutamate (Champeil-Potokar *et al.*, 2006 ; Grintal *et al.*, 2009). Dans le cadre de cette thèse, nous avons suivi une démarche en 3 étapes :

- 1) Etablissement du modèle d'étude en caractérisant l'évolution des marqueurs du métabolisme énergétique astrocytaire en fonction du degré de maturation de la culture (J6 : subconfluence, J15 : confluence, J21 : différenciation). Plusieurs paramètres, reflétant des étapes du métabolisme énergétique, ont été étudiés : les

expressions protéiques et la localisation des transporteurs GLUT1 et MCT1 pour le transport du glucose et du lactate, l'utilisation du 2-DG pour l'entrée du glucose, la mesure de la libération de lactate ainsi que l'activité de la lactate déshydrogénase intervenant dans le métabolisme du lactate.

- 2) Recherche de l'effet spécifique du DHA (AGPI n-3) en le comparant à celui de l'AA (AGPI n-6), sur ces paramètres. Pour distinguer la part d'un effet direct du DHA, de type signal tel qu'il peut intervenir *in vivo* lorsque les PLA2 activées libèrent le DHA membranaire, et celle d'un effet type membranaire, lié à l'enrichissement des phospholipides membranaires en DHA, nous comparerons les effets à court terme (30 minutes d'incubation) et à long terme (tout au long de la culture à partir de J2).
- 3) Etude de la réponse énergétique de l'astrocyte lors d'une stimulation glutamatergique, mimant l'activation neuronale.

# **MATERIELS ET METHODES**



## Approche *in vivo*

Au cours de ce travail de thèse, nous avons donc étudié l'influence de l'apport alimentaire en AGPI n-3 sur plusieurs paramètres de l'énergétique cérébrale chez le rat en utilisant 3 types de régime alimentaire :

- un régime dit équilibré en AGPI n-6 et n-3 (rapport linoléique/ $\alpha$ -linolénique de 4) renfermant des teneurs adéquates en AGPI précurseurs pour couvrir les besoins du rat au cours des périodes spécifiques de gestation-lactation et de croissance du jeune (Guesnet *et al.*, 1997) ;
- un régime déficient en AGPI n-3 qui a servi de base à toutes les études nutritionnelles conduites sur ce sujet démontrant le lien entre les AGPI n-3, le métabolisme cérébral du glucose et le transporteur GLUT1 (Pifferi *et al.*, 2005) ;
- un régime spécifiquement enrichi en acide docosahexaénoïque dont il a été montré qu'il permettait d'atteindre le niveau de saturation des membranes cérébrales en cet AGPI (Alessandri *et al.*, 2003 ; Pifferi *et al.*, 2007) et qu'il correspondait à un niveau de consommation parmi les plus élevés chez les personnes fortement consommatrices de produits de la mer (environ 1% de l'apport calorique total)(AFSSA, 2006).

La réalisation de l'ensemble de ces études a exigé la mise en œuvre de plusieurs séries d'expérimentations dont l'une a été conduite au Centre de Recherche Clinique du Centre Universitaire de Sherbrooke (Québec). Les conditions d'élevage et de sacrifice des animaux ont suivi les règles d'éthique animale de la Communauté Européenne fixant les conditions d'utilisation expérimentale des animaux de laboratoire (European Community Council Directive du 24 Novembre 1986, 86/609/EEC). En ce qui concerne l'étude réalisée au Québec au Centre de Recherche Clinique (CRC) du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, le protocole d'expérimentation a été soumis au comité d'éthique du Canada afin d'être validé (cf. Annexe 1).

Nutriments (g/kg de régime)	Régime équilibré	Régime déficient	Régime supplémenté
Caséine	220	220	220
DL-Méthionine	1,6	1,6	1,6
Cellulose	20	20	20
Mélange minéral	40	40	40
Mélange vitaminique	10	10	10
Amidon de maïs	428,3	426,9	426,9
Sucrose	214,1	213,5	213,5
Mélange huileux	66	68	68
Mélange oléisol-tournesol	26,8	68	45,8
Huile de colza	39,2	-	-
Huile de thon	-	-	22,2
Total	1000	1000	1000
<b>Densité calorique</b>			
Kcal/kg	4050	4060	4060
Mjoule/kg	16,96	17	17

**Tableau 4 : Composition en macronutriments des régimes expérimentaux**

Acides Gras (% AG totaux)	Régime équilibré	Régime déficient	Régime supplémenté
16 : 0	4,7	4,5	9,2
18 : 0	1,8	2,5	3,0
<b>Σ AG saturés</b>	7,3	7,8	14,9
18 : 1 n-9	61,3	67,2	52,3
18 : 1 n-7	3,3	2,2	2,7
<b>Σ AG monoinsaturés</b>	65,6	69,8	58,3
18 : 2 n-6	22,0	22,4	15,6
20 : 4 n-6	-	-	0,6
<b>Σ n-6</b>	22,0	22,4	16,3
18 : 3 n-3	5,2	0,1	0,2
20 : 5 n-3	-	-	2,3
22 : 6 n-3	-	-	7,4
<b>Σ n-3</b>	5,2	0,1	10,6
<b>18:2 n-6/ 18:3 n-3</b>	4,2	224	78
<b>Acides gras (mg/100g régime)</b>			
18 : 2 n-6	1307	1370	955
20 : 4 n-6	-	-	37
18 : 3 n-3	309	6	12
20 : 5 n-3	-	-	141
22 : 6 n-3	-	-	453
<b>% calories totales</b>			
18 : 2 n-6	2,9	3,0	2,1
18 : 3 n-3	0,7	0,01	0,03
20 : 5 n-3	-	-	0,3
22 : 6 n-3	-	-	1

**Tableau 5 : Composition et teneur en acides gras (AG) des régimes expérimentaux**

## **I. Animaux et régimes alimentaires**

Les animaux utilisés sont des rats adultes Wistar âgés de 8 à 10 semaines. Ils proviennent de femelles élevées au laboratoire avec un régime standard (SDS, Hersteller, Angleterre). Quinze jours avant l'accouplement les femelles sont séparées en 3 groupes recevant l'un des 3 régimes expérimentaux (témoin équilibré en AGPI n-6 et n-3, déficient en AGPI n-3, ou supplémenté en DHA). Elles ingèrent ces régimes jusqu'au sevrage des petits, les mâles étant alors sélectionnés et recevant à leur tour jusqu'à leur sacrifice le même régime que leur mère. Tous les animaux ont un libre accès à l'eau et à la nourriture (*ad libitum*) et sont placés dans des pièces contrôlées en température (20°C), hygrométrie et lumière (cycles de 12 heures de lumière 7h-19h et 12 heures d'obscurité).

Ces 3 régimes expérimentaux sont des régimes semi-synthétiques et isocaloriques (densité calorique comprise entre 4050 et 4060kcal/kg de régime), et contiennent entre 6,6 et 6,8% de lipides (en poids) (Tableau 4). Ils diffèrent uniquement sur la teneur et la nature des AGPI n-3 qu'ils renferment. Le régime équilibré apporte des quantités satisfaisantes d'acides linoléique (environ 1300mg/100g de régime soit l'équivalent de 2,9% de l'énergie totale ingérée) et  $\alpha$ -linolénique (environ 300mg/100g de régime ou 0,7% des calories ingérées) (Tableau 5). Ce régime contient 6,6% de lipides sous la forme d'huile d'oléisol-tournesol (Lesieur) et d'huile de colza (Bailly). Le régime déficient en n-3 apporte exclusivement de l'acide linoléique à un niveau équivalent à celui du régime équilibré (1300mg/100g de régime soit 3% des calories ingérées) et une quantité extrêmement réduite d'acide  $\alpha$ -linolénique (6mg/100g de régime) (Tableau 5) grâce à l'ajout du mélange huileux oléisol-tournesol (6,8g/100g). Le rapport 18:2n-6/18:3n-3 est alors très élevé puisqu'il atteint la valeur de 224 vs 4,2 dans le régime équilibré. Dans leur formulation lipidique, ces deux premiers régimes diffèrent de ceux qui ont été initialement utilisés dans les premiers travaux conduits sur ce sujet (Ximenes *et al.*, 2002 ; Pifferi *et al.*, 2005, 2007). En effet, le mélange oléisol-tournesol a remplacé l'huile d'arachide africaine qui présentait l'immense avantage de renfermer 20% d'acide linoléique et 50% d'acide oléique comme l'huile de colza, et donc de respecter des apports équilibrés en ces 2 acides gras. Cependant cette huile posait des problèmes en ce qui concerne sa teneur en acide  $\alpha$ -linolénique qui



était fluctuante et parfois non négligeable. Outre son problème d'approvisionnement qui devenait très difficile.

Acides Gras (% AG totaux)	Oléisol-Tournesol	Colza	Huile de thon
16 : 0	3,9	4,5	20,8
18 : 0	2,3	1,4	4,7
20 : 0	0,2	0,4	0,3
22 : 0	0,7	0,2	0,1
24 : 0	0,3	0,6	0,2
<b>Σ AG saturés</b>	<b>7,5</b>	<b>7,2</b>	<b>32,0</b>
16 : 1 n-9	0,0	0,0	0,6
16 : 1 n-7	0,1	0,2	5,3
18 : 1 n-9	72,5	62,1	15,3
18 : 1 n-7	0,0	0,0	2,2
20 : 1 n-9	0,3	1,0	1,5
20 : 1 n-7	0,0	0,0	0,2
22 : 1 n-9	0,0	0,2	0,2
<b>Σ AG monoinsaturés</b>	<b>72,8</b>	<b>63,5</b>	<b>25,3</b>
18 : 2 n-6	19,6	20,8	1,7
20 : 4 n-6	-	-	1,9
<b>Σ n-6</b>	<b>19,6</b>	<b>20,8</b>	<b>6,0</b>
18 : 3 n-3	0,1	8,5	0,6
20 : 5 n-3	-	-	7,3
22 : 6 n-3	-	-	25,7
<b>Σ n-3</b>	<b>0,1</b>	<b>8,5</b>	<b>36,0</b>

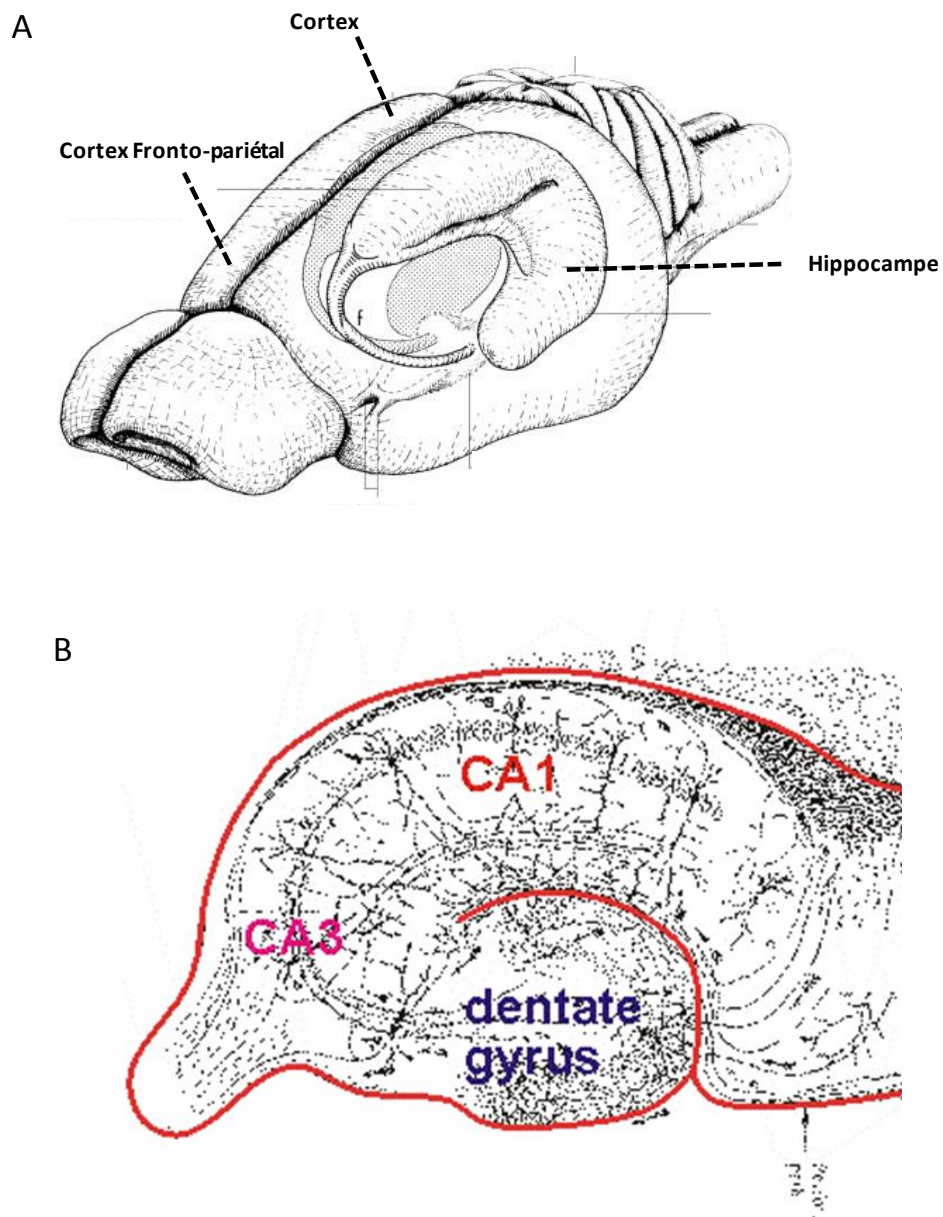
**Tableau 6 : Composition en acides gras (AG) des huiles expérimentales**

Enfin le régime supplémenté en AGPI n-3 à longue chaîne apporte 30% de moins d'acide linoléique que les deux régimes précédents (955mg/100g, 1,89% calories ingérées), très peu d'acide  $\alpha$ -linolénique et de l'acide docosahexaénoïque à raison d'environ 450mg/100g (soit l'équivalent de 1% des calories totales ingérées) (Tableau 5). Ce régime contient 6,8g de lipides pour 100g de régime sous la forme du mélange oléisol-tournesol (4,58g/100g) et d'huile de thon (2,22g/100g, Société Polaris) (Tableau 4). Les régimes se présentent sous la forme de pelletes fabriquées par l'UPAE (Unité de préparation des aliments expérimentaux, Jouy en Josas) et sont stockés à 4°C. La composition en acides gras des huiles utilisées pour formuler la base lipidique des 3 régimes expérimentaux est rapportée dans le Tableau 6.

## **II. Validité du test d'activation : Environnement Enrichi**

Dans notre étude nous avons mis au point un test comportemental (exploration d'un environnement enrichi) permettant une activation de zones cérébrales spécifiques que sont le cortex frontal et la couche CA1 de l'hippocampe, activation appréciée par une augmentation de la densité synaptique (Rampon *et al.*, 2000). Ce type de test est souvent appliqué pendant la période de développement afin de potentialiser certains processus de neurogenèse et de plasticité cérébrale en mettant en jeu des interactions sociales et des stimulations des processus moteur et sensitif (Rampon *et al.*, 2000). Sur le plan neurofonctionnel, il se traduit par une préservation des capacités cognitives chez le rongeur au cours du vieillissement.

Le protocole expérimental que nous avons finalement adopté et décrit ci-après est tiré de données et de discussions avec le groupe de Serge Laroche (Z. Penke-Verdier, Laboratoire NAMC, CNRS UMR8620, Université Paris Sud ORSAY, France). Ce protocole spécifique a été pratiqué afin de potentialiser le niveau d'apprentissage et d'activité motrice dans des tests comportementaux (Segovia *et al.*, 2008). La confirmation de l'activation de nos deux zones cérébrales d'intérêt après soumission à un environnement enrichi a été appréciée chez des rats standards par la mesure immunohistochimique de l'expression de la protéine cFos, marqueur d'activation neuronale, selon une cinétique d'exposition réalisée sur une période de 1h30.



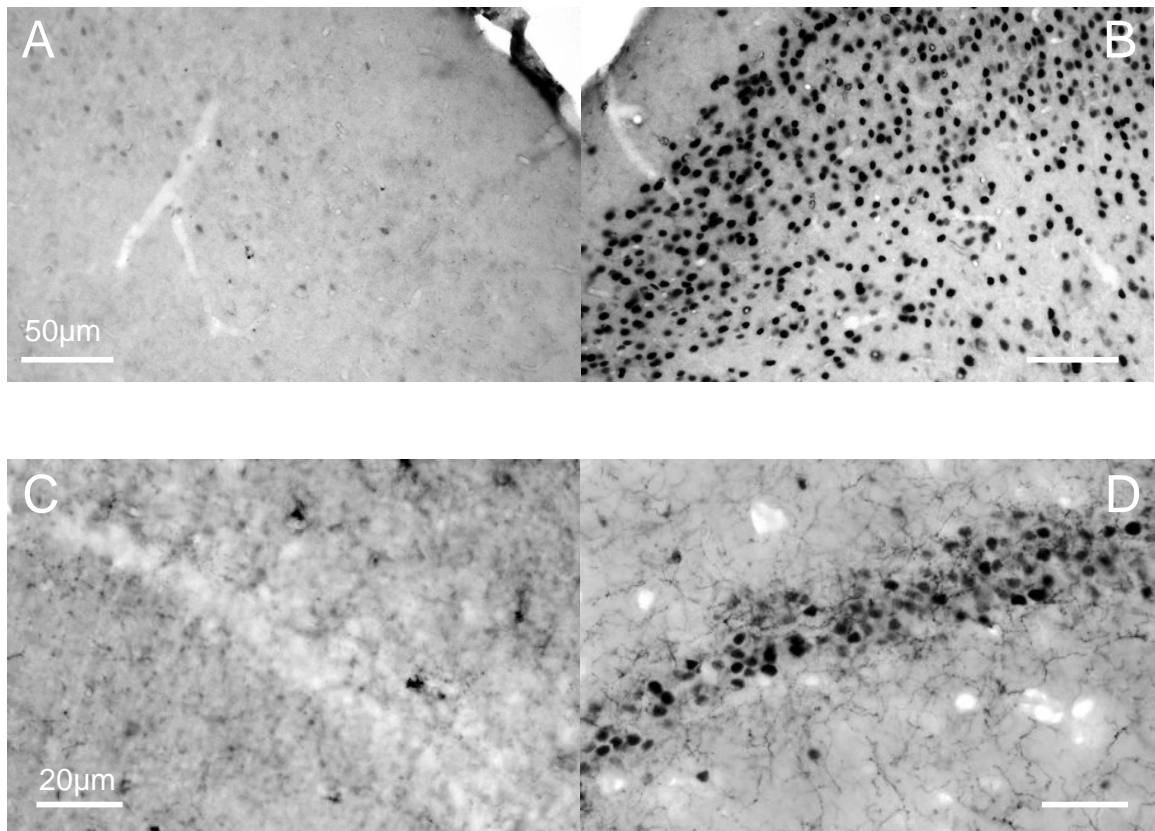
**Figure 15 : A/Localisation des zones cérébrales de notre étude (cortex fronto-pariétal et hippocampe) chez le rat. B/ Coupe de l'hippocampe.** L'hippocampe entier est déroulé pour faire apparaître les différentes couches qui le composent (CA1, CA2, CA3 et Gyrus Denté). On prélève le premier tiers supérieur de l'hippocampe déplié qui correspond à la couche CA1 de l'hippocampe.

Les animaux sont placés dans une cage de dimension définie (0,8m x 0,9m x 0,6m) contenant divers objets (tubes PVC, cubes de différentes formes et couleurs, boîtes, balles) pendant 30min, 1h, 1h30 par groupe de 2-3 animaux. Après exposition à cet environnement enrichi, les animaux sont anesthésiés avec une dose létale de 120mg/kg de pentobarbital sodique. Le cerveau est fixé par perfusion intracardiaque. Pour accéder au cœur, la cage thoracique est ouverte, une canule est placée dans l'aorte passant par le ventricule gauche. L'aorte descendante est clampée pour que la partie haute de l'animal soit fixée préférentiellement. Les animaux sont perfusés avec une solution de rinçage à 37°C contenant du NaCl 0,9%-Nitrile 1%, puis avec du paraformaldéhyde dilué à 4% dans du PBS 0,1M, pH 7,4 à 4°C. Les cerveaux sont ensuite prélevés et placés dans cette même solution de paraformaldéhyde pendant 4h à température ambiante. Puis ils sont transférés dans une solution cryoprotectrice de sucrose 30% à 4°C pendant 2 jours. Les cerveaux sont fixés sur le porte objet du cryostat puis congelés dans une solution d'isopentane entre -30 et -40°C. Des coupes de 30µm sont réalisées au cryostat (Leica CM3000, Leica, Nussloch) réglé sur -20°C. Pour le cortex fronto-pariétal, 24 coupes sont conservées, en supprimant 1 coupe sur 2, à partir du Bregma 1,60mm (apparition du corps calleux). En ce qui concerne la couche CA1 de l'hippocampe, on réalise la même procédure mais à partir du Bregma -2,30mm (Figure 15). Les différentes coupes réalisées sont mises dans des puits contenant du PBS (coupes flottantes). Pour localiser les différentes zones cérébrales à partir de leurs coordonnées stéréotaxiques (Bregma mm), nous avons utilisé un Atlas de cerveau de rat (Paxinos et Watson, 4<sup>ème</sup> édition). Le Bregma correspond au point d'intersection entre l'os frontal et les deux os pariétaux.

### **Etapas de l'immunohistochimie.**

Tout d'abord l'activité de la peroxydase endogène est bloquée par l'incubation des coupes dans une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 1,75% pendant 30 minutes. Les coupes sont ensuite placées dans du PBS Triton (PBST) 0,3% contenant 5% de sérum de cheval pendant 1h sous agitation, afin de saturer les sites non spécifiques et ainsi diminuer le bruit de fond du marquage. Le triton contenu dans le PBS permet de perméabiliser les membranes et ainsi une meilleure entrée des anticorps. Les coupes sont incubées pendant 72h à 4°C avec

l'anticorps primaire anti-cFos (Santa Cruz) produit chez la chèvre dilué au 1/100 final. L'anticorps primaire est dilué dans du PBST contenant 1% de sérum de cheval. Après



**Figure 16 : Immunohistochimie cFos.** A, C / Rat au repos. B, D/ Rat soumis à un environnement enrichi pendant 1h (activation). Les photos A-B et C-D correspondent à l'expression de cFos, respectivement, dans le cortex fronto-pariétal et la couche CA1 de l'hippocampe.

plusieurs rinçages au PBST (3 fois 1 heure), l'anticorps secondaire anti-chèvre biotinylé produit chez le cheval (Vector) dilué au 1/400<sup>ème</sup> dans du PBST est ajouté pendant 24h à 4°C.

Les coupes sont rincées 2 fois 1 heure dans du PBST et le troisième rinçage, d'une heure également, s'effectue dans du PBS sans Triton.

Les coupes sont ensuite incubées 1 heure avec le complexe Avidine Biotine Peroxydase (kit ABC Vectastain, PK6100, VECTOR) qui se fixe sur la biotine de l'anticorps secondaire permettant ainsi par méthode indirecte de révéler l'anticorps primaire.

Plusieurs rinçages dans du PBS (1 fois 1 heure et 2 fois 30 minutes) sont effectués avant de faire la révélation de la peroxydase avec une solution de diaminobenzidine (DAB SIGMA, D-5905) en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3,5%. La DAB oxydée produit un précipité brun. Le marquage est surveillé et la réaction est arrêtée en faisant des rinçages dans du PBS.

Les coupes sont ensuite montées sur les lames gélatinées. Après séchage, une étape de déshydratation est effectuée en faisant des passages successifs dans des bains d'alcool de concentration croissante de 10 minutes chacun (EtOH 70%, EtOH 95%, EtOH 100% (2 bains successifs)), puis dans 2 bains de Toluène. Puis elles sont montées entre lames et lamelles dans du Depex.

Les coupes sont ensuite observées au microscope (Olympus BH-2) et les cellules positives cFos sont comptées au niveau du cortex frontal et de la couche CA1 de l'hippocampe grâce au logiciel VisioScan (Biocom) (Figure 16).

### **III. Prélèvement du cortex et de la zone CA1 sur les animaux expérimentaux (témoins, déficients, supplémentés)**

Lors de notre étude, les rats mâles âgés de 8-10 semaines sont soumis ou non à un environnement enrichi pendant 1h. Ils sont immédiatement euthanasiés, et le cerveau est prélevé. L'hippocampe est extrait et mis de côté ; le cortex est disséqué pour ne garder que le cortex fronto-pariétal en prenant comme repère le chiasma optique. Pour prélever la couche CA1, l'hippocampe est déroulé pour faire apparaître les différentes couches qui le composent. On prélève le premier tiers supérieur de l'hippocampe déplié qui correspond à la couche CA1 (Figure 15). Ces dissections sont rapidement effectuées sur glace afin d'éviter

la dégradation de nos échantillons. Chaque tissu est divisé en 2, une partie conservée 24h à 4°C puis à -20°C dans 1,5ml de RNA later (agent stabilisateur des ARN) pour l'analyse de l'expression génique (cf. paragraphe V) et l'autre partie est congelée à sec dans l'azote puis conservée à -80°C pour les analyses protéiques et lipidiques (cf. paragraphes IV et VI).

## **IV. Composition en acides gras des phospholipides des membranes cérébrales**

Pour analyser cette composition, plusieurs étapes successives ont été réalisées. Tout d'abord une extraction des lipides totaux, puis une séparation des classes de lipides et de phospholipides sur cartouche de silice aminopropylée (technique d'extraction en phase solide), une transméthylation des AG en esters méthyliques et enfin une analyse en chromatographie en phase gazeuse (CPG) (Figure 17).

### **IV.1. Extraction des lipides totaux**

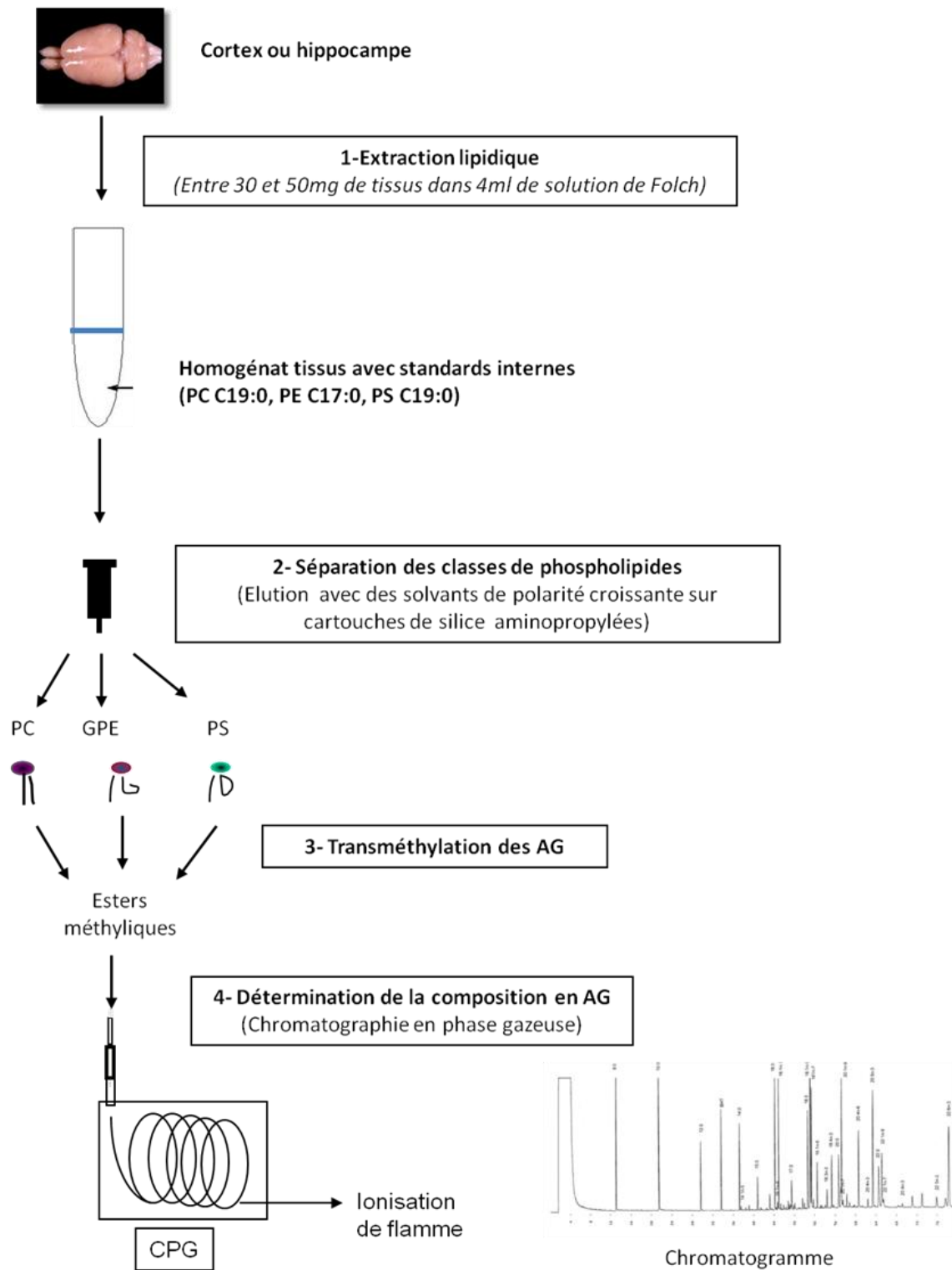
Pour extraire les lipides totaux la méthode de Folch *et al.* (1957) est utilisée. Les tissus d'intérêt sont pesés (entre 30 et 50mg) et placés dans des tubes coniques de 15ml. Pour nous permettre de quantifier les acides gras ( $\mu\text{mole/g}$  de tissu) contenus dans les tissus nerveux nous avons utilisé la méthode de standardisation interne. Un mélange de standards internes de PC C19 (54,32 $\mu\text{g}$ ) (PC C19:0, Avanti Polar Lipids), de PE C17 (52,36 $\mu\text{g}$ ) (PE C17:0, Sigma) et de PS C17 (20 $\mu\text{g}$ ) (PS C17:0, Avanti Polar Lipids) est ajouté aux tissus dans 3ml de solution de Folch (mélange de chloroforme/méthanol dans les proportions 2/1, v/v) où ils sont homogénéisés avec un broyeur de type polytron 2 fois 10 secondes. Puis 1ml de solution aqueuse de NaCl 0,73% est ajouté afin de séparer la phase chloroformique contenant les lipides totaux de la phase aqueuse renfermant le reste des molécules. Après centrifugation (30 minutes à 6000 tours/min, 4°C), deux phases se forment : une phase supérieure contenant les molécules hydrosolubles et une phase inférieure contenant les lipides totaux. La phase inférieure est rincée par 2ml de phase supérieur théorique de Folch (chloroforme/méthanol/eau 3/48/47, v/v/v), prélevée puis évaporée à sec sous azote. Les échantillons sont repris dans du chloroforme et peuvent être conservés à -20°C.

### **IV.2. Séparation des classes de lipides sur cartouches de silice aminopropylée**

Une fois les lipides totaux extraits, une étape de séparation des classes de phospholipides est réalisée. Pour cela on utilise des cartouches de silice aminopropylée selon la technique de Pietsch et Lorenz (1993), adaptée au laboratoire par Goustard-







**Figure 17 : Analyse de la composition et de la teneur en acides gras des classes de phospholipides des membranes cérébrales.**

Langelier *et al.* (2000). Les colonnes sont préparées par un lavage de 3ml d'hexane puis 3ml de solvant I (chloroforme/isopropanol 2/1, v/v). Les lipides totaux sont repris dans 500µl de solvant I et la moitié est déposée sur la colonne. Les lipides à séparer (AG libres, PE, PC, PS...) se fixent sur la phase solide de silice aminopropylée de la colonne et ensuite le passage de différents mélanges de solvants de polarité croissante va permettre d'éluer les différentes classes de lipides et de phospholipides selon leur degré de polarité (Tableau 7). Ainsi les lipides neutres (triglycérides, cholestérol) vont être élués en premier, suivis des acides gras libres. Le mélange acétonitrile/n-propanol (3/1, v/v) permet l'élution de la PC, le méthanol permet l'élution des glycérophospholipides à éthanolamine (GPE) et enfin le mélange Isopropanol/HCl méthanolique (4/1, v/v) permet l'élution de la PS. Ce sont ces trois derniers types de phospholipides que nous récolterons pour continuer nos analyses. Une fois récupérées, les fractions de phospholipides sont évaporées à sec sous azote. Concernant la PS, la fraction récupérée est mise à -20°C pour la nuit avant d'être évaporée et transméthylée la même journée. En effet dans le solvant d'élution de la PS, il y a de l'HCL méthanolique qui peut dégrader les doubles liaisons des acides gras s'il est concentré par une évaporation incomplète. Il est donc impératif de réaliser l'étape suivante (transméthylation) immédiatement après l'évaporation sous azote.

#### **IV.3. Transméthylation des acides gras**

Nous avons employé la méthode de Morrison et Smith (1964) utilisant le trifluorure de Bore (BF<sub>3</sub>) comme catalyseur de transestérification et le méthanol comme solvant. La transméthylation consiste en l'hydrolyse de la liaison ester entre l'acide gras et la structure glycéridique et la méthylation de l'extrémité carboxylique des AG ainsi libérée. En effet le trifluorure de bore, donneur d'électrons, rompt la liaison entre le glycérol et les acides gras qui sont alors méthylés par la présence de méthanol dans le milieu réactionnel. Les esters méthyliques produits seront ainsi plus volatils rendant leur séparation par chromatographie en phase gazeuse plus compatible avec la phase stationnaire choisie et le gaz vecteur.

Les classes de phospholipides (de l'ordre de 100µg) sont évaporées à sec sous azote dans un tube à vis. Le résidu est repris dans 1mL d'une solution de BF<sub>3</sub> à 10% dans le méthanol (Fluka Chimica). La réaction se fait au bain-marie à 90°C, sous agitation discontinue, pendant 20

Solvants (v/v)	Volume	Fraction éluée
<b>Solvant I</b> : Chloroforme/isopropanol (2/1)	3ml	Lipides neutres
<b>Solvant II</b> : Diéthyl éther/ acide acétique (98/2)	3ml	Acides gras libres
<b>Solvant III</b> : Acétone	1ml	
<b>Solvant IV</b> : Acétonitrile/n-propanol (3/1)	8ml	PhosphatidylCholine
<b>Solvant V</b> : Acétonitrile/n-propanol (1/1)	2ml	Sphingomyéline
<b>Solvant VI</b> : Méthanol	3ml	Glycérophospholipides à Ethanolamine
<b>Solvant VII</b> : Isopropanol/HCl méthanolique (4/1), BHT 0,005%	4,5ml	PhosphatidylSérine

**Tableau 7 : Composition des solvants d'élution utilisés pour la séparation des principales classes de phospholipides sur cartouches aminopropylées**

minutes. Elle est arrêtée dans un premier temps en laissant refroidir les tubes dans un bac d'eau froide, puis en rajoutant 1mL d'eau. L'extraction des esters méthyliques est réalisée par 500µL d'hexane. La phase hexanique est ensuite neutralisée par un lavage avec 5mL d'eau distillée et évaporée sous azote. Les esters méthyliques sont conservés dans du chloroforme à -80°C jusqu'à analyse.

#### **IV.4. Détermination de la composition en acides gras par Chromatographie en phase gazeuse**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse qui permet la séparation des molécules entre la phase mobile gazeuse contenant les esters méthyliques volatilisés et la phase stationnaire solide de la colonne. Les esters vont être séparés en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée, leur degré d'insaturation ainsi que la position de leurs insaturations. Le chromatographe (Carlo Erba, HRGC 5300, Thermo Separation Products) est équipé d'un injecteur "on-column" et d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne est une colonne capillaire (50m de longueur x 0,32mm de diamètre intérieur ; CB Wax 52 CB, Chrompack) garnie par greffage chimique d'une phase stationnaire, du polyéthylèneglycol, et le gaz vecteur est de l'hydrogène sous pression (phase mobile). Les esters méthyliques sont injectés directement *via* l'injecteur "on-column" dans une pré-colonne, à une température inférieure d'environ 10°C au point d'ébullition du solvant permettant ainsi l'augmentation de la résolution de séparation des molécules (non dispersion des molécules à séparer). La température croissante du four est programmée de 54°C à 212°C à raison d'une augmentation de 3°C par minute suivie d'un palier de 40 minutes à 212°C. Les esters méthyliques élués successivement dans la colonne sont brûlés au niveau du détecteur à ionisation de flamme, à 250°C, et forment des ions collectés au moyen de deux électrodes entre lesquelles s'applique une différence de potentiel. Il en résulte un courant électrique, proportionnel à la quantité d'atomes de carbone, recueilli par un électromètre transformateur d'impédance qui le transforme en une tension que l'on peut quantifier. L'enregistrement et le traitement du signal sont réalisés par un intégrateur (Nelson, SRA) couplé à un ordinateur qui permet d'obtenir simultanément la représentation graphique du profil d'élution des esters méthyliques d'acides gras et leurs temps de

rétenion. La surface de chacun des pics est proportionnelle à la quantité d'acides gras élués et les résultats sont exprimés en pourcentage des acides gras totaux. L'identification des composés est réalisée avec des standards purs et avec un mélange composé d'esters méthyliques d'huile de foie de morue et additionnés d'esters méthyliques de 8:0, 10:0, 12:0, 22:0 et 24:0 et de GPE de cortex cérébral pour l'identification des diméthyl acétals (DMA) issus de la transestérification des plasmalogènes.

## **V. Quantification des ARNm par la technique des cartes microfluidiques**

### **V.1. Extraction des ARN totaux des tissus**

Pour extraire les ARN totaux des tissus, le kit d'extraction Rneasy lipid Tissue Midi Kit (QIAGEN) adapté aux tissus riches en lipides tel que le cerveau est utilisé. Les tissus conservés dans le RNA later sont décongelés et environ 50mg de cortex sont repris dans 5ml de Qiazol Lysis reagent (solution monophasique de phénol et de thiocyanate de guanidine qui facilite la lyse des tissus riches en lipides et inhibe les RNases, QIAGEN). Les échantillons sont ensuite broyés avec un ultra-turrax pendant 20 secondes (9500 tours/min). L'homogénat obtenu est incubé 5 minutes à température ambiante (TA : 15-25°C). Après l'ajout d'1ml de chloroforme, le mélange est agité vigoureusement pendant 15 secondes puis incubé 2 à 3 minutes à TA et centrifugé à 5000g pendant 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse supérieure (contenant les ARN totaux) est transférée dans un tube et un volume (soit 3ml) d'éthanol 70%, passé sur un filtre 0,2µM, est ajouté. Le mélange est agité brièvement (vortex) avant d'être déposé sur une colonne RNeasy Midi spin. L'ensemble est centrifugé 5 minutes à 5000g, à TA. L'éluat est éliminé, les ARN et l'ADN contaminants étant retenus sur la colonne. L'ADN est alors digéré par une solution DNase-tampon RDD (160µl pendant 15 minutes à TA ; RNase-free DNase Set, QIAGEN). Ensuite différents tampons sont passés sur la colonne afin d'éliminer le phénol et les autres contaminants. L'ajout de chaque tampon est suivi d'une centrifugation de 5 minutes à 5000g et TA afin d'éliminer ces tampons de lavage. Les ARN totaux lavés et retenus sur la colonne sont finalement élués avec 250µl d'eau de qualité de biologie moléculaire (RNase-free water, QIAGEN) et sont ensuite stockés à -80°C.

Pour les échantillons de la couche CA1, un autre kit d'extraction, plus adapté à la faible quantité de tissu disponible, (mirVana miRNA isolation kit, Ambion) a été utilisé. Les tissus sont décongelés puis environ 20mg de CA1 sont repris dans un tube conique de 1,5ml avec 300µl de lysis/binding buffer. Un potter manuel "Kontes" avec un piston en téflon-inox est utilisé pour le broyage du tissu (2 fois 10 secondes sur glace). 1/10<sup>ème</sup> de volume de miRNA homogenate additive est ajouté à l'homogénat, puis le mélange est agité et laissé au repos 10 minutes sur glace. Ensuite un volume d'un mélange phénol/chloroforme est ajouté. Après une centrifugation de 5 minutes à 10 000g à TA, la phase supérieure est prélevée et on y ajoute 1,25 volume d'éthanol absolu. Le mélange est placé sur la colonne et centrifugé 15 secondes à 10 000g. La colonne est alors lavée par l'ajout de différents tampons de lavage suivis de centrifugations de 10 secondes à 10 000g. Les ARN totaux retenus sur la colonne sont ensuite élués avec 100µl d'eau exempte de RNases et conservés à -80°C.

Une estimation de la quantité d'ARN totaux des différents échantillons est réalisée par mesure de la densité optique (DO) à 260nm par spectrophotométrie (Biophotomètre, Eppendorf). Le rapport  $DO_{260}/DO_{280}$  permet d'évaluer la qualité de l'extrait d'ARN totaux et doit être compris entre 1,8 et 2,2 pour une préparation d'ARN de bonne qualité. Un rapport inférieur à 1,8 indique qu'il y a une contamination par des protéines. Le rapport  $DO_{260}/DO_{230}$  quant à lui permet d'évaluer la contamination par des molécules organiques de notre extrait. S'il est compris entre 2 et 2,2 on estime que notre extrait est de bonne qualité sans contamination organique.

## **V.2. Vérification de l'intégrité des ARN totaux**

Cette vérification est réalisée par électrophorèse miniaturisée sur puce grâce au bioanalyseur Agilent 2100 sur la plateforme de biologie moléculaire PICT du centre de recherche de Jouy en Josas.

La première étape consiste à déposer de façon homogène un gel filtré contenant un intercalant de l'ARN fluorescent (dye) dans chaque puits d'une puce Agilent RNA 6000 Nano. Les échantillons et le ladder (marqueur de poids moléculaire) sont dénaturés à 70°C pendant 2 minutes. Ensuite un volume de 1µl de chaque échantillon est déposé dans les puits de la puce (12 puits + 1 puits pour le ladder). Après avoir été agité pendant 1 minute, afin d'homogénéiser le tampon et les échantillons, la puce est placée dans l'appareil qui va mesurer en temps réel l'intensité de fluorescence émise en fonction du temps de rétention

des ARN. Les données qualitatives (temps de rétention) et quantitatives (intensité de fluorescence) obtenues sont validées par rapport au marqueur de poids moléculaire qui est connu par le logiciel. Celui-ci calcule alors le RIN de l'échantillon (RNA Integrity Number) qui permet d'évaluer l'intégrité des ARN des échantillons. La valeur du RIN est comprise entre 1 (ARN très dégradé) et 10 (ARN d'excellente qualité). Pour la suite de l'expérimentation seuls les échantillons avec un  $RIN > 8$  et un rapport  $DO_{260nm}/DO_{280nm} > 1,8$  sont conservés.

### **V.3. Rétrotranscription des ARNm en ADNc**

La rétrotranscription des ARNm permet la synthèse d'ADN complémentaire simple brin (ADNc) grâce à la reverse transcriptase. Elle est réalisée avec un kit de rétrotranscription (High Capacity cDNA reverse transcription, Applied Biosystems). Tout d'abord un mélange réactionnel de 50µl est préparé, il contient un tampon de rétrotranscription, un mélange de dinucléotides, des amorces et l'enzyme reverse transcriptase (50U/µl). Pour chaque échantillon un volume correspondant à 1µg d'ARN totaux est pipeté et complété avec de l'eau de qualité biologie moléculaire pour obtenir un volume final de 50µl. Ensuite les 50µl du mélange réactionnel sont ajoutés aux 50µl de l'échantillon pour la réaction. Celle-ci se déroule dans un thermocycleur à 25°C pendant 10 minutes puis à 37°C pendant 2 heures. Les ADNc obtenus sont dilués au ¼ et stockés à -20°C.

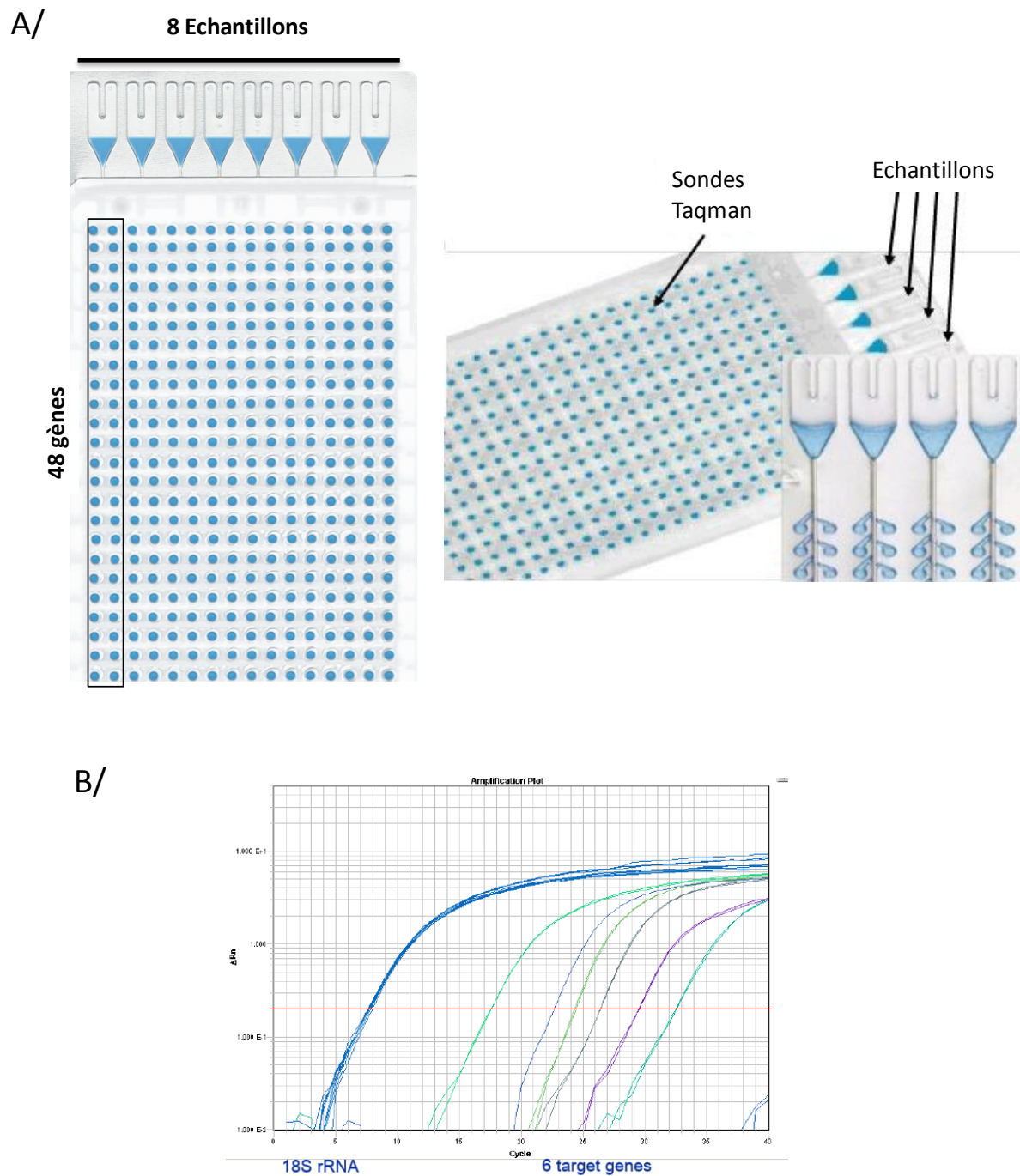
### **V.4. Quantification des transcrits d'intérêt par la méthode des TaqMan Low Density Arrays (TLDA) ou cartes microfluidiques**

Cette technologie permet la quantification simultanée de l'expression d'un nombre important de gènes sur plusieurs échantillons différents, selon la configuration des cartes choisies, ceci dans un volume réactionnel moindre. La technique est très reproductible du fait d'une grande sensibilité et spécificité.

Pour notre étude, nous avons choisi une configuration nous permettant de quantifier simultanément pour 8 échantillons différents l'expression de 44 gènes intervenant dans les étapes clés du métabolisme énergétique cérébral, plus un gène marqueur de l'activation (cfos) et un gène de référence (18S). Dans chaque puits, un couple d'amorces et une sonde TaqMan spécifiques du gène d'intérêt sont présents (Figure 18). On les sélectionne à partir



de leur numéro d'accèsion et à partir d'essais prédéfinis (TaqMan gene expression Assays, Applied Biosystems) (Tableau 8).



**Figure 18 : Taqman Low Density Arrays (TLDA) ou cartes microfluidiques (Applied Biosystem).** A/ Configuration des TLDA afin de quantifier simultanément l'expression de 48 gènes sur 8 échantillons. B/ Courbes d'amplification des ADNc des gènes d'intérêt par PCR quantitative en temps réel.

Gènes	N°Genbank	Fonction
<b>Slc2a1 (GLUT1)</b>	NM_138827	Transport glucose
<b>Slc2a3 (GLUT3)</b>	NM_017102	Transport glucose
<b>Slc16a1 (MCT1)</b>	NM_012716	Transport lactate
<b>Slc16a7 (MCT2)</b>	NM_017302	Transport lactate
<b>Slc16a4 (MCT4)</b>	NM_001013913	Transport lactate
<b>Slc1a2 (GLT1)</b>	NM_017215	Transport glutamate
<b>Slc1a3 (GLAST)</b>	NM_019225	Transport glutamate
<b>Atp1a2</b>	NM_012505	NaK ATPase
<b>Atp1a3</b>	NM_012506	NaK ATPase
<b>Hk1</b>	NM_012734	Glycolyse
<b>Gpi</b>	NM_207592	Glycolyse
<b>Pfkip</b>	NM_206847	Glycolyse
<b>Pfkm</b>	NM_031715	Glycolyse
<b>Gapdh</b>	NM_017008	Glycolyse
<b>Pgk1</b>	NM_053291	Glycolyse
<b>Eno1</b>	NM_001109908	Glycolyse
<b>Eno2</b>	NM_139325	Glycolyse
<b>Pkfr</b>	NM_012624	Glycolyse
<b>Pkm2</b>	NM_053297	Glycolyse
<b>Gsk3a</b>	NM_017344	Glycogénèse
<b>Gsk3b</b>	NM_032080	Glycogénèse
<b>Ldh1</b>	NM_017025	Voie du lactate
<b>Ldh5</b>	NM_012595	Voie du lactate
<b>Pdha1</b>	NM_001004072	Voie du lactate
<b>Pdha2</b>	NM_001007620	Voie du lactate
<b>Glul</b>	NM_017073	Voie du glutamate
<b>Gls</b>	NM_001109968	Voie du glutamate
<b>Cs</b>	NM_130755	Cycle de Krebs
<b>Idh3g</b>	NM_031551	Cycle de Krebs
<b>Mdh1</b>	NM_033235	Cycle de Krebs
<b>Mdh2</b>	NM_031151	Cycle de Krebs
<b>Me1</b>	NM_012600	Cycle de Krebs
<b>Ndufa5</b>	NM_012985	Phosphorylation oxydative
<b>Sdha</b>	NM_130428	Phosphorylation oxydative
<b>Uqcrc1</b>	NM_001004250	Phosphorylation oxydative
<b>Uqcrc2</b>	NM_001006970	Phosphorylation oxydative
<b>Cox6c</b>	NM_019360	Phosphorylation oxydative
<b>Cox8a</b>	NM_134345	Phosphorylation oxydative
<b>Atp5g1</b>	NM_017311	Phosphorylation oxydative
<b>Atp5h</b>	NM_019383	Phosphorylation oxydative
<b>Atp5j</b>	NM_053602	Phosphorylation oxydative
<b>Atp5d</b>	NM_139106	Phosphorylation oxydative
<b>Atp5b</b>	NM_134364	Phosphorylation oxydative
<b>Atp5o</b>	NM_138883	Phosphorylation oxydative

**Tableau 8 : Numéro d'accèsion et fonction principale des 44 gènes étudiés du métabolisme énergétique cérébral.**

Les sondes TaqMan sont des oligonucléotides spécifiques des séquences à amplifier marquées en 5' par un fluorophore appelé Reporter (R) et en 3' par un autre fluorophore, Quencher (Q). La sonde s'hybride entre les 2 amorces, après excitation, le R ne réémet pas la totalité de son énergie sous forme de fluorescence. En effet une partie de cette fluorescence est absorbée par l'effet quenching de Q. La deuxième étape est celle de l'élongation des amorces par la Taq-polymerase qui, par son action exonucléasique, entraîne le clivage de l'extrémité 5' de la sonde et donc la libération de R. Ce dernier, libéré de l'effet quenching de Q, va émettre un signal fluorescent proportionnel au nombre de produits de PCR formés et permet ainsi de suivre en temps réel l'augmentation du nombre de copies polymérisées à chaque cycle.

Les ADNc (55µl) dilués au ¼ sont mélangés avec 55µl de Mix, puis 100µl de ce mélange sont déposés sur les cartes microfluidiques. Après deux centrifugations d'une minute chacune à 12 000 tours/min, la carte est scellée puis déposée dans l'appareil à haut débit ABI Prism 7900 (Applied Biosystems, France) sur la plateforme PICT du centre de recherche INRA de Jouy en Josas.

#### **V.5. Normalisation et analyse des résultats**

Pour effectuer l'analyse de nos résultats nous avons utilisé le logiciel RQ Manager utilisant la méthode du  $\Delta\Delta Ct$  (ou quantification relative normalisée par un calibrateur). La quantification s'effectue au niveau de la partie linéaire de l'exponentielle, première partie de la courbe d'amplification. Cette analyse fait également appel au principe du Ct (Cycle Threshold ou cycle seuil) qui est le nombre de cycles requis pour que l'émission de fluorescence soit plus élevée que le bruit de fond. L'abondance des ADNc des gènes d'intérêt est normalisée par rapport à celle du gène référence (18S) selon la formule suivante :

$$\text{Abondance}_{\text{gène intérêt}} / \text{Abondance}_{18S} = 2^{-\Delta Ct}$$

$$\text{avec } \Delta Ct = Ct_{\text{gène intérêt}} - Ct_{18S}$$

Cette abondance est ensuite normalisée par rapport à un calibrateur, pour notre étude les rats témoins en situation basale ayant reçu le régime équilibré dans notre étude. Pour ce groupe, l'abondance normalisée par rapport au gène de référence, est ramenée à 1. L'expression relative ou abondance relative de nos gènes d'intérêt est calculée avec la formule des  $\Delta\Delta Ct$  :

$$\text{Abondance relative}_{\text{gène intérêt}} = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct)_{\text{calibrateur}}} / 2^{-(\Delta Ct)_{\text{échantillon}}}$$

## **VI. Analyse protéique : quantification des transporteurs GLUT1 et MCT2 par Western Blot**

### **VI.1. Principe**

Cette méthode permet de détecter et d'estimer la quantité d'une protéine à partir d'un homogénat de tissus ou de cellules. Les protéines sont tout d'abord séparées par électrophorèse selon leur taille. Puis une étape permettant de transférer les protéines sur un support solide est réalisée. Une immunochimie utilisant un anticorps spécifique constitue l'étape finale afin d'identifier et d'estimer la quantité de notre protéine d'intérêt (quantification par rapport à une protéine de référence la  $\beta$ -Actine) (Figure 19).

### **VI.2. Protocole**

#### VI.2.1. Extraction des protéines des tissus d'intérêt

Les tissus (cortex fronto-pariétal et couche CA1 de l'hippocampe) sont pesés (environ 300mg pour le cortex) puis homogénéisés au potter dans 800 $\mu$ l de tampon de lyse, Tris HCl Chaps anti-protéases. Les homogénats sont ensuite passés aux ultrasons 2 fois 10 secondes sur la glace puis stockés à -80°C.

#### VI.2.2. Dosage des protéines selon la méthode de Lowry

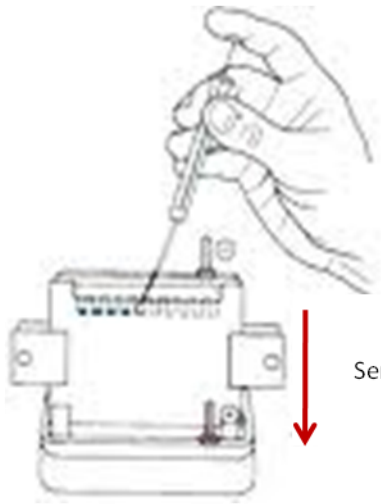
Le dosage des protéines repose sur la méthode colorimétrique de Lowry qui consiste en la réaction entre les protéines des échantillons et les ions cuivre en solution suivie d'une réduction du réactif de Folin.

Une fois les protéines extraites des tissus, un premier dosage est réalisé afin de déterminer la concentration de solution mère de l'homogénat pour pouvoir ramener la concentration de la solution à 4mg/ml. Chaque échantillon est dosé, une deuxième fois, avant que la protéine soit analysée par western blot. La première étape est de préparer une gamme étalon de BSA (de 0 à 2mg/ml) diluée dans le même tampon de lyse que celui utilisé pour les échantillons. Cette gamme déposée dans les mêmes conditions que nos

échantillons permettra de déterminer la concentration en protéine de nos échantillons. Cinq  $\mu$ l de chaque échantillon sont déposés en triple sur la plaque. Ensuite les solutions du kit DC

#### **Préparation des échantillons :**

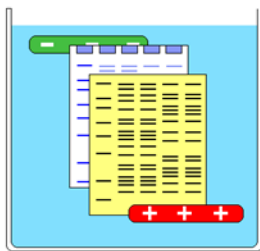
Lyse des tissus, dénaturation des protéines



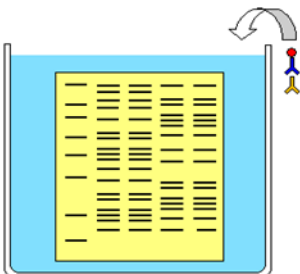
#### **Electrophorèse sur gel de polyacrylamide**

Séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire

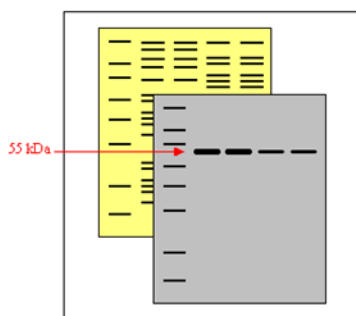
Sens de migration



Transfert en milieu liquide des protéines sur membrane de PVDF



Hybridation de la membrane avec anticorps primaire, anticorps secondaire couplé à la peroxydase



Révélation du marquage par chemiluminescence et détection sur phosphoimageur

**Figure 19 : Principe du Western Blot**

Protein Assay (BioRad) sont ajoutées, avec tout d'abord 25µl de la solution A' (préparée à partir des solutions A, contenant les ions cuivre, et S). Pour finir, 200µl de la solution B ou réactif de Folin, sont additionnés dans les puits. Après 15 minutes d'agitation, la plaque est placée dans le lecteur de microplaque (Tecan Spectra Fluor Plus) afin de mesurer l'absorbance à 660nm. Cette étape est importante car elle permet de déposer une quantité de protéines suffisante pour quantifier un signal sans avoir une saturation de ce dernier.

#### VI.2.3. Western Blot (Figure 19)

Pour la détection des protéines d'intérêt GLUT1 et MCT2, 30 et 5µg de protéines d'échantillon de cortex sont respectivement déposés sur gel. Une fois le dosage des protéines effectué, les échantillons sont dilués au ½ dans un tampon Sample Buffer (SB), dénaturant qui contient un agent réducteur de ponts disulfure (dithiothréitol, DTT 0,2M) et un détergent anionique, le sodium dodecyl sulfate (SDS 20mM), qui dénature la chaîne protéique et la recouvre de charges négatives. Il masque ainsi les charges naturelles des protéines qui acquièrent une densité de charge identique. Ce processus va permettre aux protéines d'être séparées selon leur taille et donc de leur masse molaire uniquement. Le SB contient également du glycérol (20%) qui augmente la densité du lysat et donc facilite le dépôt sur gel, et du bleu de bromophénol (0,005%), colorant permettant de suivre la migration.

**Migration.** Les échantillons préparés dans le tampon de charge (SB) sont déposés (25µl) dans les puits des gels à gradient d'acrylamide (Mini-protean TGX 4-15%, BioRad). Ces gels sont positionnés dans une cuve d'électrophorèse contenant le tampon de migration (Tampon 1X : Tampon 10X Tris/Glycine/SDS (Biorad) ; H<sub>2</sub>O ultra pure). Dans un des puits, 15µl de marqueur de poids moléculaire (BioRad Precision Plus Protein Standard) sont déposés. L'électrophorèse se fait à 30mA pendant environ 2 heures à température ambiante.

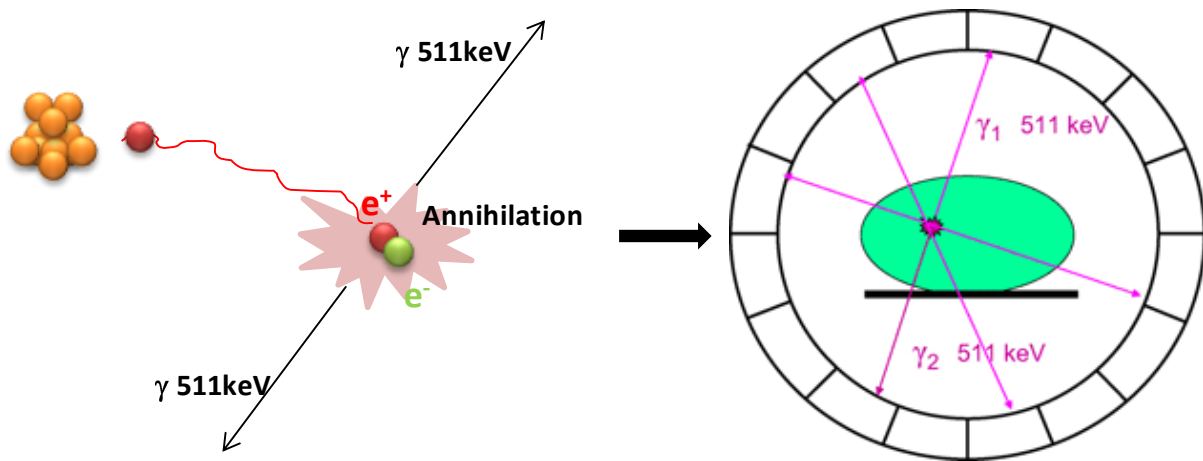
**Transfert.** Les protéines sont transférées en milieu liquide (Tampon 1X : Tampon 10X Tris/Glycine (BioRad) ; Ethanol 20% ; H<sub>2</sub>O ultra pure) sur une membrane de PVDF (PolyVinylidène DiFluoride, Immobilon-P transfer membranes, SIGMA) préalablement

équilibrée dans du tampon de transfert pendant 10 minutes. Le transfert est réalisé sur la nuit à 4°C à 20V.

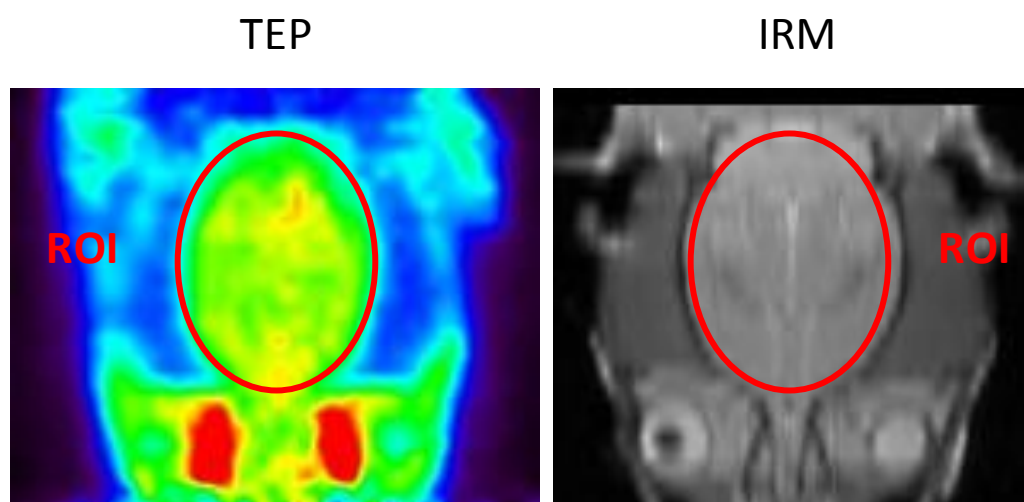
**Hybridation.** Le lendemain, les membranes sont rincées dans du TBST (Tris HCl 0,02M, NaCl 0,14M, Tween20 0,1%, pH7,6). Elles sont ensuite incubées pour une étape de saturation dans du TBST contenant 5% de lait écrémé pendant 8h à 4°C (ou 2h à température ambiante) sous agitation. Cette étape limite les fixations non spécifiques des anticorps sur la membrane. Les membranes sont ensuite mises en présence de l'anticorps primaire, GLUT1 (C-20, Santa Cruz) et MCT2 (CHEMICON) dilué au 1/250 et au 1/1000, respectivement, dans du TBST-Lait 5% toute la nuit à 4°C (ou 2 heures à température ambiante) sous agitation. Après 4 rinçages de 20 minutes avec du TBST, les membranes sont incubées dans l'anticorps secondaire, anti-chèvre (Jackson Laboratories, dilution 1/5000) pour GLUT1 et anti-lapin (Jackson Laboratories, dilution 1/50000) pour MCT2, couplé à l'enzyme HorseRadish Peroxydase (HRP) pendant 2 heures à température ambiante, sous agitation et dans l'obscurité. Les membranes sont rincées pendant 2 heures, puis révélées par réaction chimique entre la peroxydase et le kit ECL+ (enhanced chemiluminescent, ECL+, Amersham Biosciences). Une caméra (phosphoimageur, Fujifilm Las-1000 Plus system) détecte l'émission de chemiluminescence. La densité optique du marquage de notre protéine d'intérêt, identifiée grâce au marqueur de poids moléculaire, est mesurée à l'aide du logiciel AIDA (Advanced Image Data Analyser).

Afin de contrôler la spécificité de variations de l'expression de nos protéines d'intérêt, l'expression de la  $\beta$ -Actine, protéine dite de "référence", est mesurée sur les membranes. Une fois la révélation de nos protéines GLUT1 ou MCT2 réalisée, les membranes sont rincées et de nouveau réhybridées avec l'anticorps primaire anti- $\beta$ -actine (clone AC-74, Sigma, dilution 1/10000) et avec l'anticorps secondaire anti souris (Jackson Laboratories, dilution 1/50000) selon le même protocole que pour GLUT1 et MCT2. La densité optique de nos protéines sera normalisée par rapport à celle de la  $\beta$ -Actine de la même membrane.





**Figure 20 : Processus d'annihilation.** Le principe de la TEP (tomographie par Emission de Positons) repose sur ce processus. Une molécule contenant un isotope radioactif émetteur de positons ( $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ) est injectée à un organisme. Les positons émis par ces molécules ont la propriété de s'annihiler lors de leur rencontre avec un électron près de leur lieu d'émission. Ce processus conduit à l'émission de 2 photons  $\gamma$  de 511keV dans des directions opposées. La trajectoire de ces photons est détectée par le collimateur de la caméra TEP constitué de détecteurs qui permettent de capter le rayonnement, de localiser l'émission et ainsi la concentration du radio-traceur au niveau de chaque point de l'objet.



**Figure 21 : Quantification relative de l'utilisation cérébrale du glucose (2-déoxyglucose marqué au Fluor-18) par imagerie TEP dans les zones cérébrales d'intérêt (ROI).** Pour chaque animal, la zone d'intérêt est déterminée sur une image IRM. L'image TEP est ensuite superposée avec l'IRM afin d'obtenir une quantification relative de l'activité dans ROI.

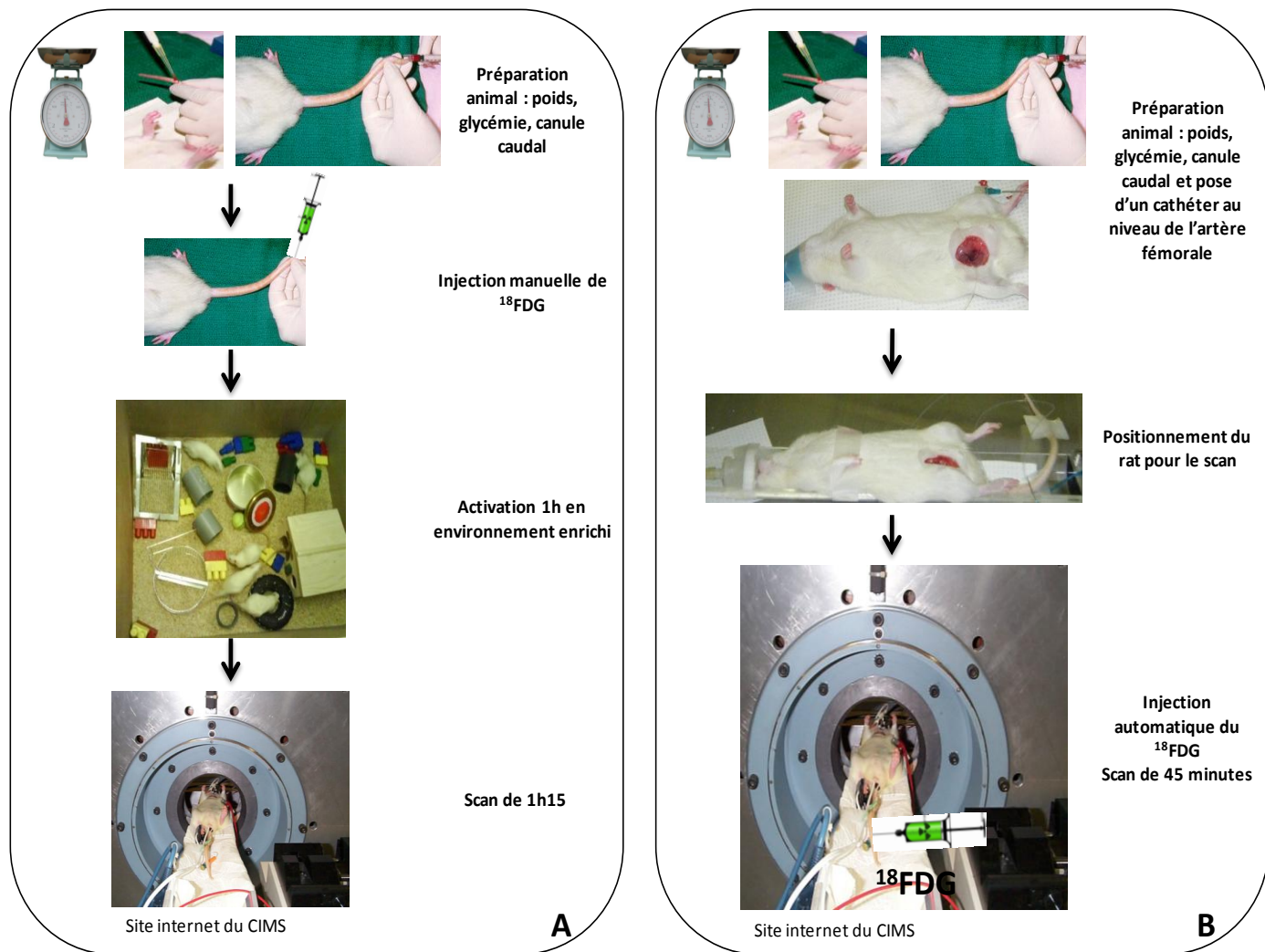
## **VII. Mesure du taux d'utilisation du glucose par une technique d'imagerie : la Tomographie par Emission de Positons (TEP)**

### **VII.1. Principe**

La TEP est une technique d'imagerie scintigraphique qui mesure dans un organisme les photons émis par des molécules radio-marquées émettrices de positons (ou électrons positifs). C'est donc une méthode de visualisation et de suivi de la distribution de ces molécules et donc de leur métabolisme dans les tissus de l'organisme, ce qui fournit une image plus fonctionnelle qu'anatomique, d'où la dénomination de technique d'imagerie fonctionnelle. Son principe repose sur l'injection intraveineuse d'un traceur biologique contenant un isotope radioactif ( $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ), émetteur de positon. Les émetteurs de positons sont des éléments de numéro atomique faible et de période courte qui présentent l'immense avantage de ne pas modifier les structures et donc les propriétés biologiques du traceur qui est généralement une petite molécule (choline, dopamine, glucose, sodium, thymidine, tyrosine,...). Ils sont caractérisés par un noyau contenant un excès de charges positives et leur désintégration vers un état stable, passant par une transformation d'un proton en neutron, provoque l'émission d'un positon. Les positons émis présentent la propriété remarquable de s'annihiler lors de leur rencontre avec un électron à proximité de leur lieu d'émission. Ce processus d'annihilation va entraîner l'émission de 2 photons gamma de 511KeV dans des directions opposées (à  $180^\circ$ ). La trajectoire de ces photons est ensuite détectée par le collimateur, composé de détecteurs, de la caméra TEP (Figure 20). Les détecteurs, composés d'un cristal scintillateur et d'un photomultiplicateur, permettent de capter le rayonnement, de localiser l'émission et ainsi la concentration du radio-traceur au niveau de chaque point de l'objet.

Les informations mesurées sont stockées dans une matrice, sinogramme, contenant l'ensemble des éléments de projection d'une coupe d'un objet. Une étape de reconstruction est donc nécessaire afin de déterminer l'objet à partir de ses projections. Pour cela, il est nécessaire de calculer la distribution de la radioactivité au sein du plan de coupe utilisant l'ensemble des informations rangées dans cette matrice. Suite à cette reconstruction et à

une série de corrections de phénomènes physiques (coïncidences aléatoires, coïncidences diffusées, atténuation) et de calibrations, la concentration radioactive de chaque pixel est



**Figure 22 : Protocoles expérimentaux de mesure d'utilisation cérébrale de glucose ( $^{18}\text{F}$ FDG) par imagerie TEP. A/ Protocole d'activation avec mesure en point final (2h15 après l'injection du  $^{18}\text{F}$ FDG) ; B/ Protocole dynamique évaluant la cinétique d'entrée du  $^{18}\text{F}$ FDG au cours des 45 minutes suivant son injection.**

déterminée à partir des images obtenues. Pour cela des zones d'intérêt (ROI) sont déterminées sur une image IRM de l'objet. La superposition avec l'image TEP va permettre d'obtenir une quantification relative de l'image (Figure 21). Une mesure d'un fantôme cylindrique (mire) ayant une concentration radioactive connue est effectuée. On obtient ainsi le facteur d'étalonnage de la caméra nous permettant d'avoir une quantification absolue en convertissant les coups/pixel en kBq/ml. Les résultats des quantifications sont exprimés en SUV (Standardized Uptake Value), basée sur le rapport entre la fixation du traceur et la dilution homogène du traceur dans l'objet, selon la formule suivante :

$$\text{SUV} = \text{Fixation (Bq/ml)} / (\text{Activité (Bq)} / \text{Poids (kg)})$$

Pour notre étude nous avons utilisé comme traceur le 2-déoxyglucose marqué au Fluor-18 ( $^{18}\text{FDG}$ ), analogue non métabolisable du glucose. Ce dernier va être transporté par le transporteur GLUT1 et phosphorylé par l'hexokinase (1<sup>ère</sup> étape de la glycolyse) avant de s'accumuler dans la cellule de façon proportionnelle à la quantité de glucose utilisé. Sa demi-vie, durée nécessaire pour que l'activité d'une source soit divisée par 2, est de 110 minutes.

## **VII.2. Protocole d'activation (Figure 22-A)**

### VII.2.1. Préparation de l'animal

Le protocole est réalisé sur un animal mis à jeun la veille. Le rat est anesthésié dans une caisse de contention avec de l'isoflurane (2% dans 1,5% d'oxygène). Une fois endormi l'animal est pesé et positionné sur un coussin chauffant afin de maintenir sa température, un masque étant appliqué sur son museau afin de le garder anesthésié sous courant d'isoflurane. Un cathéter contenant une solution saline est placé au niveau de la veine caudale. A l'extrémité un bouchon est vissé afin de permettre l'injection lors de l'expérimentation du radio-traceur. Dans une seringue, 300µl de solution saline non héparinée est préparée (flush) pour permettre le rinçage après l'injection du radio-traceur.

### VII.2.2. Injection du $^{18}\text{FDG}$

L'animal anesthésié est positionné sur un coussin chauffant derrière un mur de plomb afin de protéger le manipulateur. Une dose de 90MBq de  $^{18}\text{F}$ FDG est préparée dans un volume de 300 $\mu\text{l}$  de solution saline dans une seringue de 1ml. Au niveau du bouchon du cathéter, le  $^{18}\text{F}$ FDG est injecté manuellement. Une fois l'injection finie, la solution saline non héparinée est injectée pour rincer la canule et permettre d'entraîner le radio-traceur resté dans la canule. Le système d'injection (la canule et la seringue) est mis dans le puits de comptage afin de mesurer l'activité résiduelle.

Le rat est mis dans la caisse d'activation pour son réveil. L'animal va rester dans cet environnement enrichi pendant 1 heure à partir de son réveil. Suite à l'activation, l'animal est de nouveau anesthésié avec de l'isoflurane et placé sur le dos sur le lit d'IRM avec les différents capteurs nécessaires au suivi des paramètres vitaux (respiration, température, rythme cardiaque) afin d'être scanné. L'animal est positionné sous la caméra de façon à obtenir une image du cerveau une fois l'acquisition d'1h15 réalisée. Le rat est ensuite remis dans sa cage pour le réveil et attendre la décroissance du radio traceur.

Pour chaque animal une mire est réalisée, cette étape consiste à mettre une quantité connue de  $^{18}\text{F}$ FDG dans un volume donné. Une acquisition de 5 minutes de cette mire est réalisée et va servir de calibrateur pour les analyses des images.

### **VII.3. Protocole de dynamique (Figure 22-B)**

Ce deuxième protocole est réalisé sur les animaux ayant subi le premier protocole la semaine précédente. Le début de la préparation est la même que précédemment mais une fois la canule positionnée au niveau caudal, l'animal subit une chirurgie pour l'installation d'un cathéter au niveau de l'artère fémorale. Ce cathéter permettra de relier un compteur sanguin à l'animal. L'animal, toujours sous isoflurane, est placé sous la caméra sur le dos. En parallèle une seringue contenant 70MBq de  $^{18}\text{F}$ FDG dans 300 $\mu\text{l}$  de solution saline est préparée et positionnée sur une pompe d'injection automatique. Le radio-traceur est injecté par la pompe en même temps que débute l'acquisition. Au bout de 45 minutes, l'acquisition est finie et l'animal est euthanasié sous  $\text{CO}_2$ . Une mire est également réalisée pour ces animaux.

#### **VII.4. Reconstruction et quantification du taux de $^{18}\text{F}$ FDG accumulé**

Les images sont reconstruites avec 15 itérations selon la séquence suivante : 1 x 30sec, 12 x 5sec, 4 x 15sec, 2 x 30sec, 8 x 1min, 7 x 2min, 4 x 5min. Afin de déterminer au mieux nos zones cérébrales, les animaux subissent un IRM. Ensuite les images TEP et IRM sont superposées et des zones d'intérêt sont délimitées à partir de l'image d'IRM à l'aide du logiciel AMIDE. Ainsi on obtient la quantité relative qui permet d'obtenir, suite à un calibrage avec la mire, une quantification absolue que l'on exprime en SUV.

# Approche *in vitro*

## I. Cultures d'astrocytes

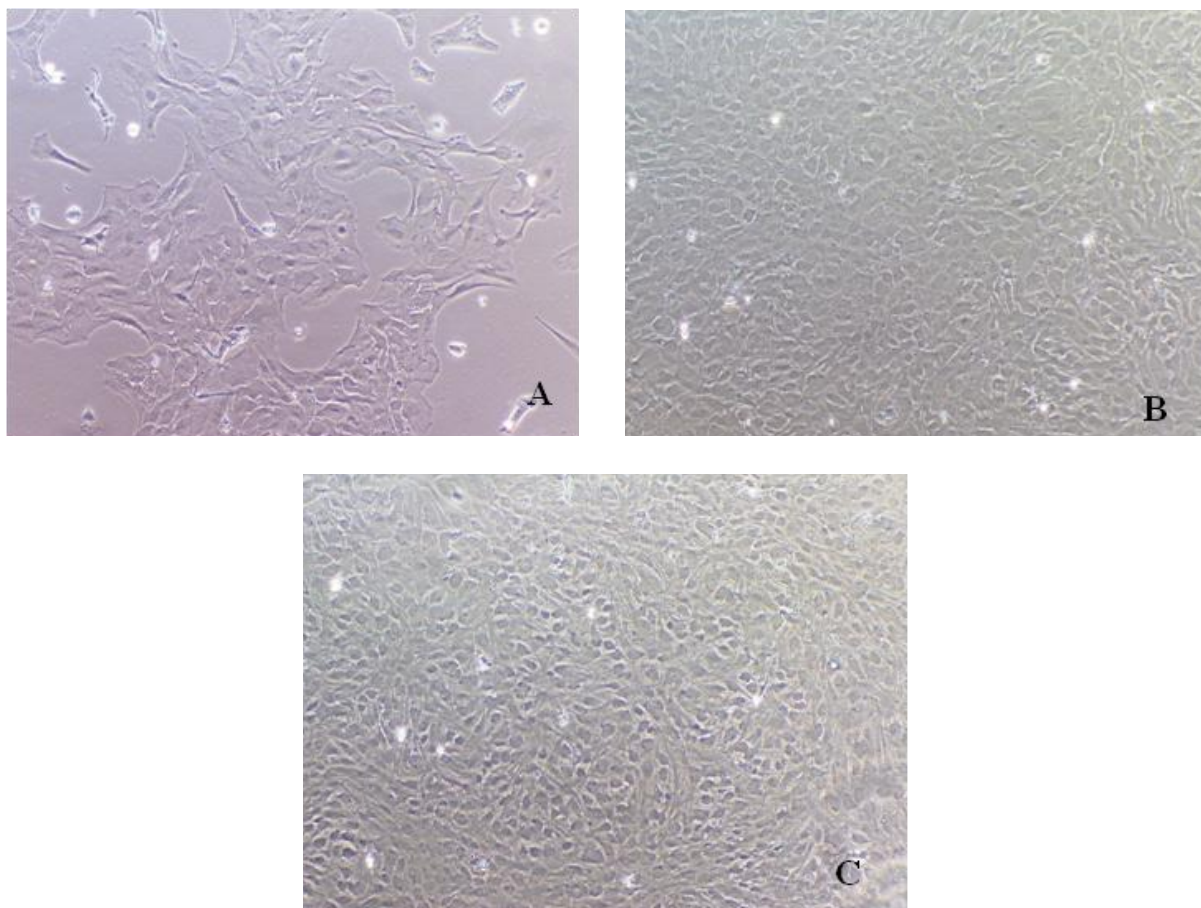
### I.1.Principe

A partir de cortex cérébraux de rats nouveau-nés, les cultures d'astrocytes sont préparées selon la méthode de Booher et Sensenbrenner (1972) adaptée dans le laboratoire (Champeil-Potokar *et al.*, 2006). Cette culture comporte 2 étapes, la culture primaire suivie de la culture secondaire au cours de laquelle les astrocytes sont sélectionnés. La culture cellulaire nécessite une manipulation en conditions stériles. Les différentes étapes de la manipulation des astrocytes, de la mise en culture aux expérimentations proprement dites, sont effectuées sous une hotte à flux laminaire horizontal permettant d'éviter les contaminations dans les boîtes de culture. En dehors des manipulations sous la hotte, les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C dont l'atmosphère est saturée en humidité et contient 5% de CO<sub>2</sub> pour le maintien du pH à 7,4 en présence de bicarbonate.

### I.2.Culture primaire

Les rats sont décapités et leurs cerveaux sont extraits pour être disséqués sur glace en conditions stériles. Une fois les méninges éliminées, le cortex est prélevé et dissocié dans une seringue jusqu'à l'obtention d'une suspension cellulaire. Cette dernière est filtrée avec un filtre nylon de 40µm et centrifugée 8 minutes à 1800 tours/min (centrifugeuse labofuge 400). Le culot obtenu est repris dans du milieu complet (MEM). Ce milieu correspond au Milieu Essentiel Minimum de Eagle enrichi avec du glucose (7mM), un mélange d'acides aminés essentiels (50X, GIBCO), de la L-glutamine (2mM final, GIBCO), des vitamines (100X), du bicarbonate (0,075%, GIBCO) et un mélange d'antifongiques/antibiotiques (Pénicilline 200UI/ml, Streptomycine 200µg/ml, Fungizone 500pg/ml). Le glucose, les acides aminés, la glutamine et les vitamines sont des éléments nutritifs essentiels pour le développement des cellules. Le bicarbonate permet de tamponner le milieu de culture en présence de CO<sub>2</sub>. Le MEM a été préalablement préparé à 4°C et supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, GIBCO). Les cellules sont ensuiteensemencées dans un volume de 20ml de milieu dans des flasques de 75cm<sup>2</sup> (avec les cortex de 6 rats, 2 flasques de 75cm<sup>2</sup> sontensemencés). Trois jours après la mise en culture, les milieux sont renouvelés et ensuite tous les 2-3 jours.





**Figure 23 : Observation par microscopie optique de l'évolution du tapis cellulaire au cours de la culture d'astrocytes (x200).** A/ Stade de pré-confluence (J6) caractérisé par des cellules dispersées formant un tapis cellulaire lâche. B/ Stade de confluence (J15) caractérisé par un tapis cellulaire dense, les astrocytes ont un aspect pavimenteux. C/ Stade de différenciation (J21) où les astrocytes ont un aspect plus effilée dans un tapis cellulaire dense.

### **I.3.Élimination des cellules contaminantes** (microglie, oligodendrocytes, fibroblastes)

Cette étape s'effectue sur des cellules ayant atteint le stade de pré-confluence (Figure 23-A) c'est-à-dire 6-7 jours après la mise en culture en effectuant une technique de décollement sélectif. Pour cela, les cellules sont rincées avec 10ml d'une solution saline de HANKS (KCl ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; NaCl ;  $\text{NaHCO}_3$  ;  $\text{NaHPO}_4$  ; D-Glucose ; Rouge phénol) ne contenant ni calcium ni magnésium en agitant 4 fois pendant 10 secondes toutes les minutes pendant 4 minutes. Cette étape permet de détacher les cellules du support sauf les astrocytes. Ensuite les cellules sont ré-incubées dans du MEM-10% SVF à 37°C.

### **I.4.Culture secondaire**

Le repiquage a lieu lorsque les cellules sont confluentes soit 10-15 jours après le début de la culture (Figure 23-B). Les cellules sont rincées deux fois par du milieu sans sérum, puis incubées avec 1mL de trypsine 0,25% et EDTA 1mM (GIBCO) pendant 5 minutes à l'étuve afin de décoller le tapis cellulaire. Les cellules en suspension qui sont en présence de trypsine-EDTA sont récupérées dans un tube contenant du SVF pur afin de stopper l'action protéolytique de la trypsine.

Afin de récupérer toutes les cellules présentes dans la flasque, 3 rinçages sont faits avec du milieu complet supplémenté en SVF 10%. Puis deux centrifugations successives de 8 minutes à 1800 tours/minutes permettent de rincer les cellules de la trypsine qui pourrait rester. Les cellules sont reprises dans du MEM-10% SVF puis dissociées avec une seringue.

Les cellules sont dénombrées sur cellules de Malassez et réensemencées dans des boîtes de culture, 6-12 puits (Western Blot et dosage du 2-DG respectivement) ou des boîtes de diamètre 10cm pour les biotinylation, à la densité de 13000 cellules/cm<sup>2</sup>.

## **II. Supplémentation des cultures en AGPI**

### **II.1. Supplémentation des cultures à court terme**

Le but de cette supplémentation est d'évaluer l'effet rapide, direct, du DHA et de l'AA. Les cellules sont privées de sérum, source d'AGPI et en particulier de DHA et d'AA, pendant 2 heures puis incubées pendant 30 minutes avec du milieu supplémenté en AGPI (30µM

concentration finale). Les cellules sont ensuite récoltées pour les différentes expérimentations et dosages à réaliser.

## **II.2. Supplémentation des cultures à plus long terme (6 jours)**

Le but est d'évaluer un effet de type membranaire du DHA et de l'AA. Les cellules non supplémentées en AGPI sont déficientes en AGPI n-3, les cellules supplémentées en DHA ont des membranes équilibrées en DHA, alors que celles supplémentées en AA présentent des membranes enrichies en AA (Champeil *et al.*, 2006). Lors du changement de milieu à J15, les cellules sont incubées dans du milieu complet 10% SVF contenant du DHA ou de l'AA à 30µM final. Pour limiter la peroxydation des AGPI, de la vitamine E est également ajoutée dans le milieu de culture (30µM final). Deux changements de milieu supplémenté en AGPI sont effectués avant expérimentation sur les cellules.

## **III. Activation par le glutamate**

Pour mimer l'action du glutamate lors d'une activation cérébrale, les cellules sont mises en présence d'une concentration de 200µM de glutamate pendant 30 minutes avant la récolte des cellules.

## **IV. Biotinylation des protéines membranaires**

### **IV.1 Principe**

La biotinylation permet de marquer spécifiquement les protéines de la membrane plasmique sur des cellules vivantes. Cette méthode utilise un réactif biotynylant qui ne traverse pas les membranes cellulaires, le sulfosuccinidyl-2-(biotinamodo)ethyl-1,3-dithiopropionate (NHS-SS-Biotin) (Pierce, Rockford IL). Les protéines membranaires sont biotynylées et peuvent ainsi être distinguées des protéines cytoplasmiques lors de la lyse des cellules. La séparation se fait par fixation des protéines membranaires biotynylées à un gel d'avidine (Figure 24).

### **IV.2 Protocole**

L'ensemble des manipulations est réalisé à 4°C. Les cellules sont mises au 21<sup>ème</sup> jour de culture en présence d'AGPI pendant 30 minutes puis sont rincées 2 fois avec du PBS Ca-Mg (CaCl<sub>2</sub> 1mM ; MgCl<sub>2</sub> 0,1mM) avant une incubation de 30 minutes dans le NHS-SS-Biotin.

Un rinçage puis une incubation de 30 minutes dans du tampon de Quenching permet l'arrêt de la réaction de biotinylation. Les cellules sont à nouveau rincées par du PBS Ca-Mg froid à

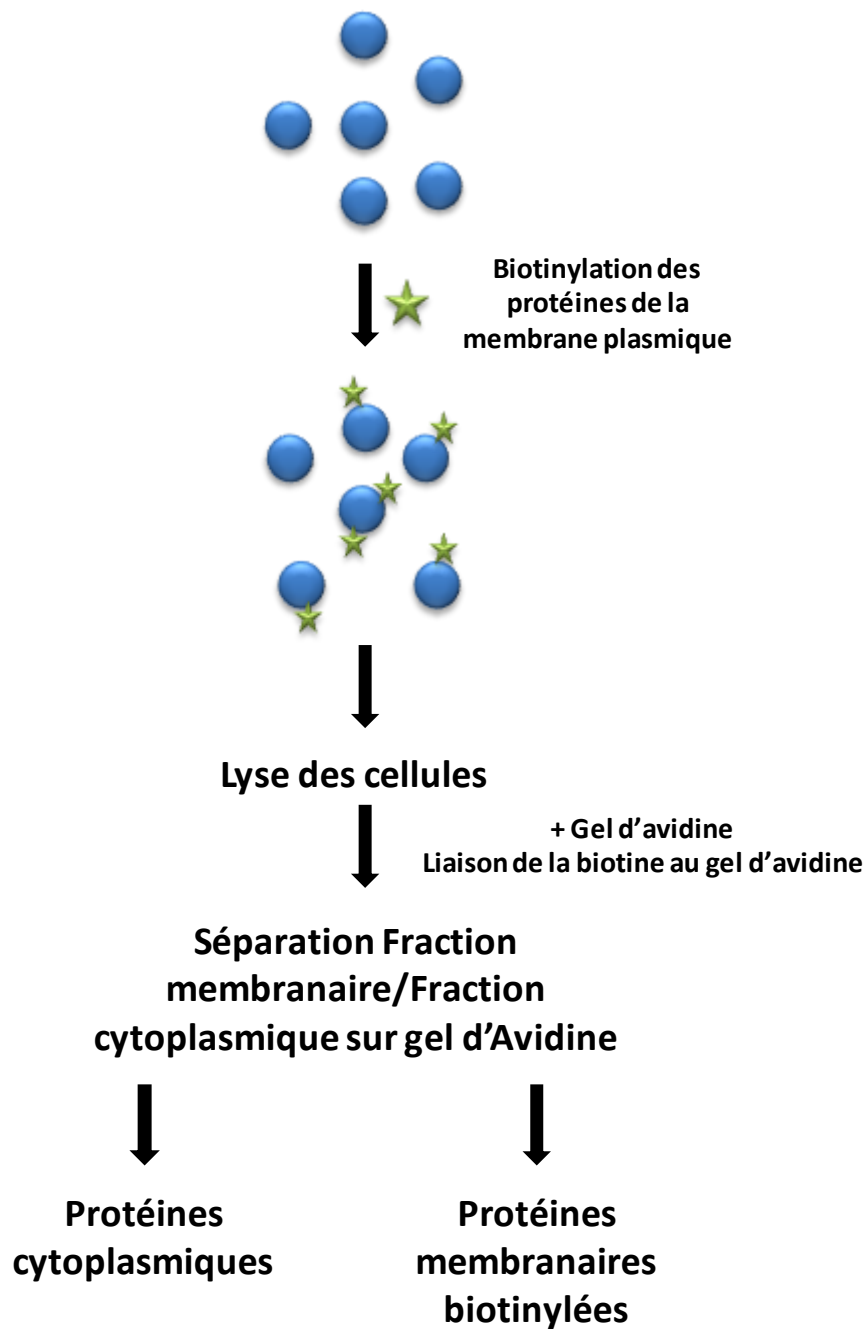


Figure 24 : Principe de marquage spécifique des protéines membranaires par la technique de biotinylation.

3 reprises avant d'être incubées dans 600µl de RIPA (Radio ImmunoPrecipitation Assay) contenant des Anti Protéases (Roche) pendant 30 minutes.

#### **IV.3 Récupération de la fraction contenant les protéines totales**

Le lysat cellulaire est récupéré et centrifugé pendant 15 minutes à 12 000 tours/minute à 4°C. Le surnageant est réparti en trois fractions : 75µl serviront au dosage des protéines totales, 150µl auxquels sont ajoutés 50µl de SB4X (Sample Buffer) seront utilisés pour la quantification par Western Blot, et 300µl sont mis en présence de gel d'avidine (1/1, v/v) sous agitation circulaire pendant une nuit à 4°C pour assurer une bonne liaison de la biotine au gel d'avidine.

#### **IV.4 Récupération de la fraction contenant les protéines cytoplasmiques**

L'homogénat est centrifugé 12 minutes à 9000 tours/minute à 4°C (Eppendorf 5415R), le surnageant constitue la fraction des protéines cytoplasmiques. Cette fraction est diluée avec du SB4X (3/1, v/v), puis conservée à -20°C.

#### **IV.5 Récupération des protéines membranaires biotinylées**

Les culots sont rincés par centrifugations successives (9000 tours/min pendant 12min à 4°C) par 2 fois 600µl de RIPA+AP, puis 500µl de tampon High Salt (Tampon No Salt ; EDTA ; NaCl ; Triton 100X), et 500µl de tampon No Salt (Tris Base 0,6%, pH7,5). Le culot protéines/avidine est repris dans 250µl de SB2X/DTT puis incubé à 37°C. Cette étape est effectuée deux fois, le surnageant constitue la fraction de protéines membranaires.

Les différentes fractions protéiques récupérées (totales, membranaires, cytoplasmiques) seront analysées par Western Blot.

### **V. Western Blot**

Les échantillons d'un volume total de 20µl contenant 10µg de protéines totales pour GLUT1 et 15µg pour MCT1 sont déposés dans les puits des gels à 12% d'acrylamide (Biorad®). Les étapes de migration et de transfert sont réalisées comme pour les échantillons *in vivo* (paragraphe 6).

La membrane est ensuite incubée dans du TBST lait pour bloquer les sites non spécifiques, puis avec les anticorps primaires anti-GLUT1 (SantaCruz) dilué au 1/200<sup>ème</sup> et

anti-MCT1 (Millipore) au 1/1000<sup>ème</sup> pendant 1h à température ambiante et rincée par du TBST (4 rinçages de 30 minutes). La membrane est incubée pendant 1h30 avec les anticorps secondaires anti-chèvre (Jackson Laboratories) au 1/10 000<sup>ème</sup> final pour GLUT1 et anti-lapin (Jackson Laboratories) au 1/30 000<sup>ème</sup> final pour MCT1. Après plusieurs rinçages dans le TBST, la révélation des membranes est effectuée avec le kit ECL+.

Pour mesurer l'expression de la  $\beta$ -actine utilisée comme protéine de référence, la membrane est rincée pendant 2h dans du TBST, puis hybridée avec l'anticorps anti-actine (clone AC-74, Sigma dans du TBST lait à la dilution 1/10 000<sup>ème</sup>), puis avec l'anticorps secondaire anti-souris (Jackson Laboratories, dilution 1/60 000<sup>ème</sup>).

## VI. Suivi de l'incorporation de glucose par les astrocytes

Le 2-deoxy-D-[2,6-<sup>3</sup>H] glucose (2-DG ; activité spécifique = 51Ci/mmol) est un analogue du glucose qui est capté par les cellules *via* les transporteurs GLUT1. Cet analogue subit exclusivement la première étape de la glycolyse et s'accumule dans la cellule proportionnellement à la quantité de glucose consommée car son dérivé 6-phosphate ne peut ressortir de la cellule. Cette méthode mesure donc l'utilisation de 2-DG par les cellules, ce qui comprend le captage et cette première étape de la glycolyse. La méthode consiste à incuber les cellules pendant un temps déterminé avec le 2-DG tritié (méthode adaptée de Yu *et al.* 1993).

Les cellules en boîtes de 12 puits, sont incubées dans du MEM sans SVF pendant 4h, puis 14,4 $\mu$ M de 2-DG sont ajoutés (t=0). Après toutes les 15 minutes sur une heure, les cellules sont rincées 3 fois par 1mL de PBS froid pour stopper l'incorporation de glucose puis lysées dans 750 $\mu$ L de NaOH à 0,2M afin de mesurer la quantité de radioactivité accumulée (compteur à scintillation liquide) et de doser les protéines totales.

Les résultats obtenus grâce au calcul suivant sont exprimés en nombre de désintégrations par minutes (dpm) :

**Incorporation (fmol/min/mg de protéines)**

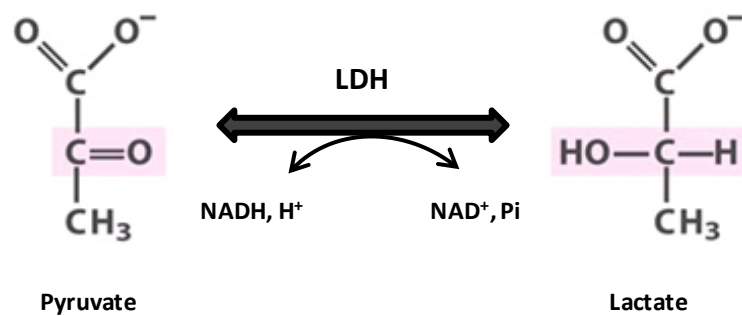
=

**(Dpm\*1000)/ (51\*2200)/ (Tps d'incubation\*Quantité de protéine totale)**

Avec 51 $\mu$ Ci/nmol = activité spécifique du 2-DG

Et 1 $\mu$ Ci = 2,2\*10<sup>6</sup> dpm

La mesure d'utilisation du glucose des cellules en culture a été réalisée à plusieurs stades : J6 (subconfluence), J15 (confluence) et J21 (différenciation cellulaire) (Figure 23). Lors de ces séries de mesure, il a été montré que l'utilisation de 2-DG était linéaire sur une période d'une heure.



**Figure 25 : Transformation du lactate en pyruvate par la lactate déshydrogénase (LDH).** En présence de NAD, le lactate est oxydé en pyruvate par la LDH. Cette réaction forme du NADH dont la concentration est mesurée par spectrophotométrie à 340nm.

## **VII. Dosage du lactate libéré par les astrocytes**

En présence de NAD, le lactate est oxydé en pyruvate par la lactate déshydrogénase et forme du NADH dont la concentration est mesurée par spectrophotométrie à 340nm (Figure 25).

Pour chaque stade cellulaire, lors de la récupération des cellules, le milieu est prélevé. A 10µl de ce milieu sont ajoutés 7µl de tampon Tris à 0,1M ; 2,5µl de HCl à 0,1N ; 10µg de NAD ; 0,5µl d'hydrazine (54,4%) qui forme un complexe piégeant le pyruvate, ce qui force la réaction dans le sens lactate/pyruvate et non pyruvate/lactate. Une première lecture à 340nm est effectuée (blanc). La lactate déshydrogénase (25 000UI, Sigma) est ajoutée et démarre la réaction. Après une heure d'incubation à température ambiante la densité optique (DO) est mesurée.

Avant chaque prélèvement et mesure, 700µL de milieu complet sont incubés pendant 24h dans les mêmes conditions que les cellules, puis dosés comme témoin. Ce milieu permet de s'affranchir du lactate présent dans le milieu de culture ne résultant pas d'une libération cellulaire.

Il est à noter que pour les mesures après une supplémentation à court terme, le dosage a été adapté à un spectromètre UVIKON 950 à cuves pour pallier la faible teneur du milieu en lactate après 30 minutes d'incubation. Trois cent microlitres d'échantillon ont été dosés afin d'avoir une différence de DO acceptable. Au préalable, la linéarité du dosage a été établie avec une échelle d'échantillons s'échelonnant de 20µl à 300µl.

## **VIII. Dosage de l'activité de la LDH (Lactate Déshydrogénase 5)**

L'activité de la LDH 5 a été quantifiée par l'oxydation du NADH en présence d'une concentration saturante de pyruvate (Figure 25). Quinze microgrammes de protéines de chaque échantillon sont mis en présence de 50µl de pyruvate à une concentration de 0,5mM (condition saturante). La réaction démarre avec l'ajout de 50µl d'une solution de NADH à 0,1mM. La concentration de NADH dans le milieu réactionnel est mesurée par spectrophotométrie à 340nm sur 2 minutes. Ce dosage a été mis au point à partir de la méthode de Bergmeyer de 1965. Les quantités de cofacteur et de protéines ont été choisies en s'inspirant des articles d'O'Brien (2007) et Saad (2006). La concentration de substrat



(pyruvate) nécessaire pour saturer l'enzyme (400 $\mu$ M) a été préalablement déterminée par une étude activité-concentration de pyruvate comprise entre 50 et 500 $\mu$ M.

## **IX. Dosage des protéines**

Le dosage est réalisé sur microplaque de 96 puits (Greiner) par colorimétrie (kit DC Protein Assay de Biorad<sup>®</sup> basé sur le dosage de Lowry) (Cf paragraphe **VI.2.2** de la partie *in vivo*).

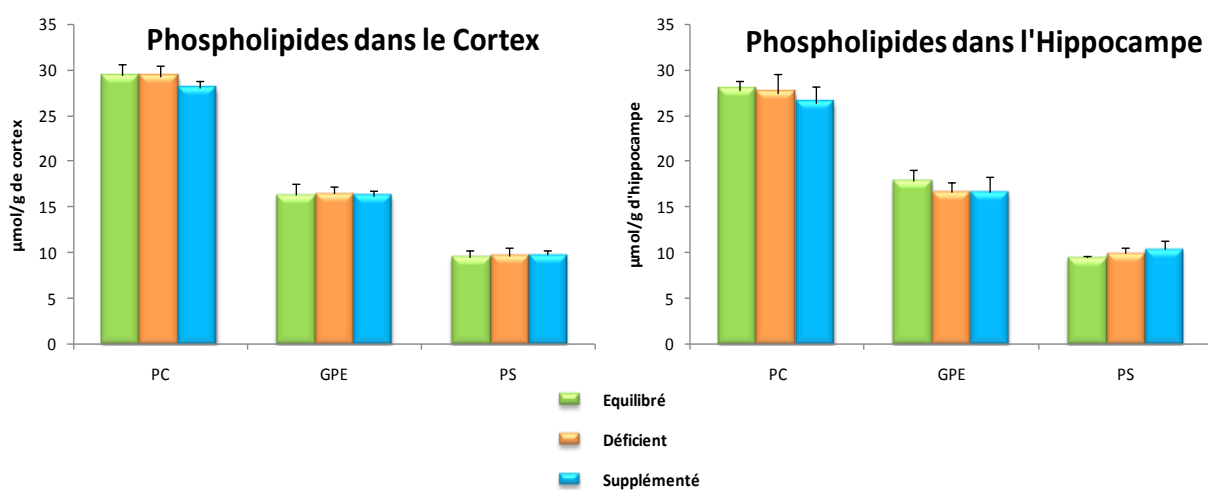
# **Analyses Statistiques**

Pour tester les effets de la déficience alimentaire en AGPI n-3 et de l'apport alimentaire en DHA sur le statut lipidique des zones cérébrales, les analyses statistiques ont été réalisées par analyse de variance à 1 facteur (ANOVA), le seuil de signification étant fixé à  $P < 0,05$  (test PLSD) (SigmaStat 3.1 software, Advisory Statistics for Scientists). Ce type d'analyse statistique a été également réalisé pour traiter les données expérimentales de l'étude d'imagerie TEP et de l'étude *in vitro* conduite sur les astrocytes en culture. Des analyses de variance à deux facteurs (régime, état d'activation) ont été réalisées pour évaluer l'effet de l'apport alimentaire en AGPI n-3 (déficience, supplémentation) et du test d'activation sur l'expression des gènes du métabolisme énergétique cérébral, le seuil de signification étant fixé à  $P < 0.05$  (test PLSD).

# RESULTATS

	PhosphatidylCholine (PC)	GlycéroPhospholipides à Ethanolamine (GPE)	PhosphatidylSérine (PS)
<u>Cortex</u>			
Equilibré	29,4 ± 1,2	16,3 ± 1,3	9,5 ± 0,7
Déficient	29,3 ± 1,2	16,5 ± 0,7	9,7 ± 0,8
Supplémenté	28,0 ± 0,8	16,2 ± 0,6	9,8 ± 0,4
<u>Hippocampe</u>			
Equilibré	27,8 ± 1,0	17,8 ± 1,3	9,4 ± 0,2
Déficient	27,5 ± 2,0	16,6 ± 1,1	9,9 ± 0,7
Supplémenté	26,4 ± 1,8	16,6 ± 1,7	10,4 ± 0,9.

**Tableau 9 : Concentration des 3 classes majeures de phospholipides** (µmole/g) dans le cortex et l'hippocampe de rats ayant ingéré un régime équilibré n-6/n-3, déficient en n-3 ou supplémenté en DHA. Les valeurs sont exprimées en µmol/g de tissu sur la moyenne de 6 échantillons (±SD).



**Figure 26 : Proportion des 3 principales classes de phospholipides dans le cortex et l'hippocampe en fonction des 3 régimes expérimentaux.** PC : phosphatidylcholine ; GPE : glycérophospholipides à

éthanolamine ; PS : phosphatidylsérine. Les valeurs sont exprimées en  $\mu\text{mol}$  d'acides gras/g de tissus sur la moyenne de 6 échantillons ( $\pm\text{SD}$ ). Il n'y a pas de différence en fonction du régime de la proportion de les 3 principales classes de phospholipides dans le cortex et l'hippocampe.

## Approche *in vivo*

### 1<sup>ère</sup> PARTIE

## Impact de l'apport alimentaire en AGPI n-3 sur le métabolisme énergétique cérébral

### I. Analyses lipidiques

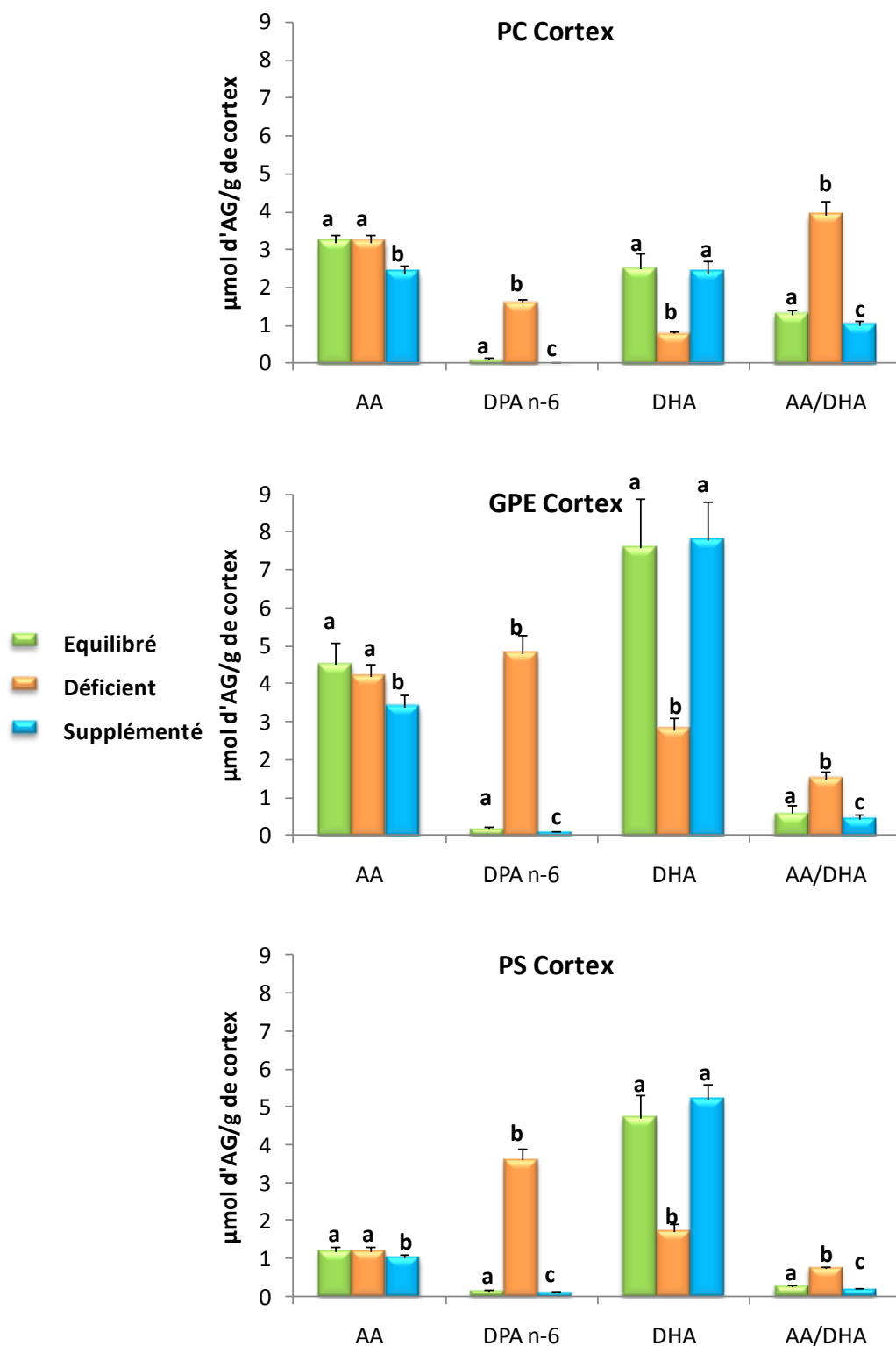
#### I.1.Zones cérébrales

Pour l'analyse lipidique des zones cérébrales, les résultats des concentrations des classes de phospholipides ainsi que leurs teneurs en acides gras sont exprimés en  $\mu\text{mol/g}$  de tissu, en plus du mode d'expression classiquement utilisé (% d'acides gras totaux). Ceci nous permet une étude comparative et relative qui renseigne sur la réelle importance des acides gras quelle que soit la classe à laquelle ils appartiennent, mais également sur des variations éventuelles des concentrations cérébrales en classes de phospholipides liées à l'apport alimentaire en AGPI n-3 (Kim et *al.*, 2010).

##### I.1.1. Cortex

L'analyse lipidique a permis de déterminer la concentration tissulaire des 3 classes majeures de phospholipides (PhosphatidylCholine : PC, GlycéroPhospholipides à Ethanolamine : GPE et PhosphatidylSérine : PS) ainsi que leur composition en acides gras. Dans le cortex des rats ayant reçu le régime équilibré, la concentration en PC, la classe de phospholipides majoritaire puisqu'elle représente 53% des phospholipides analysés, est de  $29\mu\text{moles/g}$  de tissu chez les animaux ayant reçu le régime équilibré en AGPI. Pour leur part, les concentrations en GPE et en PS sont respectivement situées autour de 16 et  $10\mu\text{moles/g}$  de tissu, représentant respectivement 29% et 18% de l'ensemble des phospholipides (Tableau 9). La concentration en AGPI dans chacune de ces 3 classes de phospholipides dépend moins de la spécificité tissulaire que de l'estérification spécifique de chaque acide gras dans chaque classe. Ainsi les GPE sont les plus riches en DHA, dont la proportion représente 25% de l'ensemble des acides gras de cette classe, soit une concentration de 7,6

$\pm 0,5\mu\text{mol}$  de DHA lié aux GPE/g de cortex (Figure 27 ; Annexes 1 et 2). La PS est tout aussi riche en DHA (27% des AG totaux) mais la teneur en PS étant moindre que celle des GPE,



**Figure 27 : Composition en AA, DPA n-6 et DHA des 3 classes de phospholipides (PC, GPE et PS) dans le cortex des rats recevant un régime équilibré en AGPI n-6/n-3, déficient en n-3 ou supplémenté en DHA.** PC : phosphatidylcholine ; GPE : gly rophospholipides   éthanolamine ; PS : phosphatidylsérine. Les valeurs sont exprimées en  $\mu\text{mol d'acides gras/g de cortex}$  sur la moyenne de 6 échantillons ( $\pm\text{SD}$ ). ANOVA 1, post-test : Tukey test

la concentration en DHA lié à la PS ne représente que  $4,7 \pm 0,6 \mu\text{mol/g}$  de cortex. La PC, classe la plus abondante dans le cortex, ne contient que 5% de DHA, soit une concentration en DHA lié à la PC de seulement  $2,5 \pm 0,4 \mu\text{mol/g}$  de cortex (Figure 27 ; Annexes 1 et 2). Les GPE se distinguent également par leur forte concentration en acide arachidonique (AA), ( $4,2 \pm 0,3 \mu\text{mole/g}$  de cortex soit 14% des acides gras totaux). La quantité totale d'AA estérifié dans la PC est conséquente ( $3,2 \pm 0,2 \mu\text{mole/g}$  de cortex pour seulement 6% des acides gras totaux), tandis que celle liée à la PS est 3 fois moins élevée.

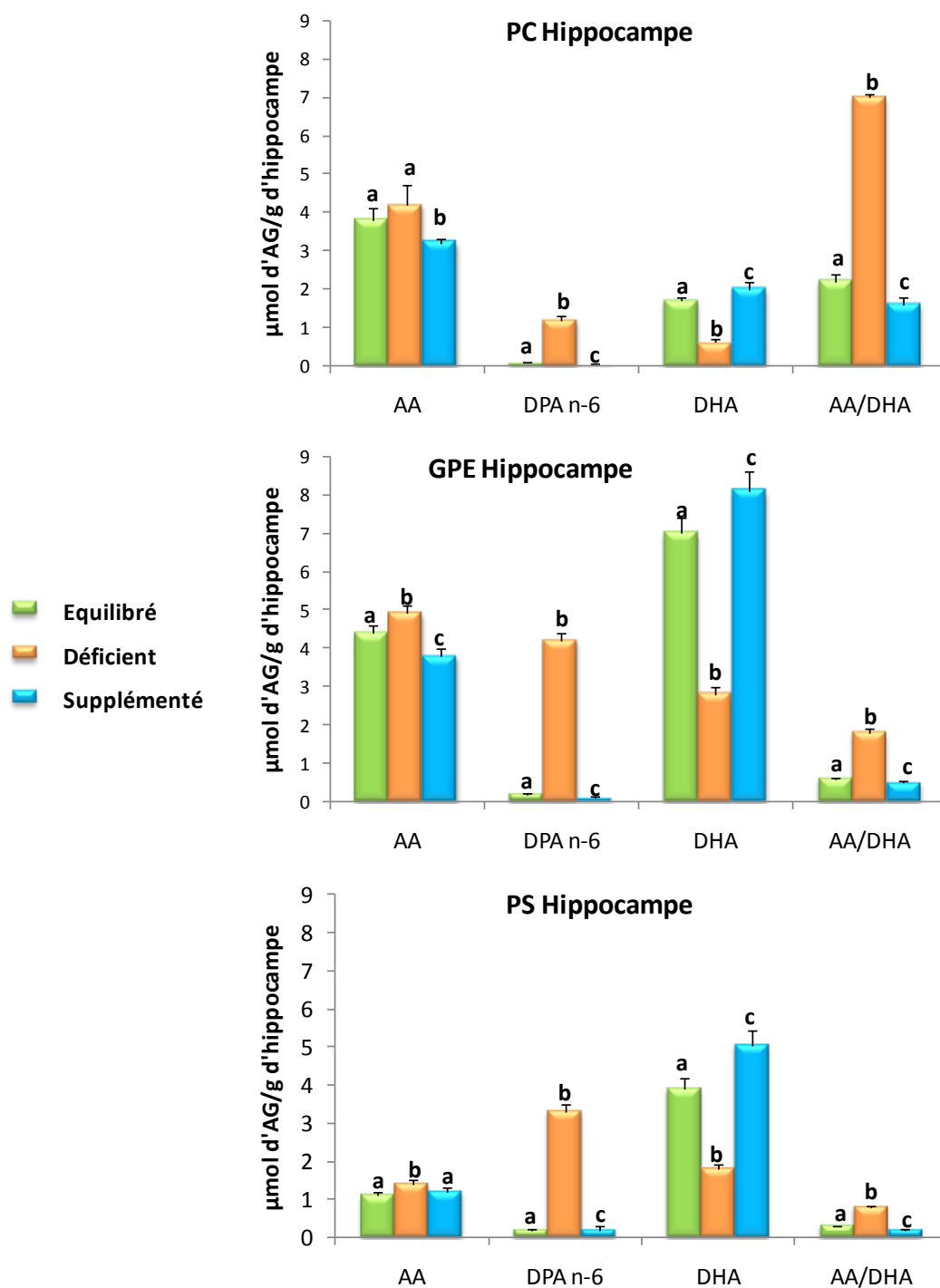
La déficience alimentaire chronique en AGPI n-3 n'induit aucune modification des concentrations tissulaires des 3 classes de phospholipides (Figure 26, Tableau 9). En revanche, elle provoque des altérations importantes de leur teneur en AGPI. En effet, on observe une diminution marquée et du même ordre de grandeur dans les 3 classes de la teneur en DHA (soit -67% dans la PC, -62% dans les GPE et -65% dans la PS) qui est compensée par l'augmentation spécifique de la teneur en DPA n-6. La teneur en AA reste, pour sa part, constante. La teneur en DHA étant fortement abaissée, le rapport AA/DHA est augmenté d'un facteur 3 marquant ainsi le déséquilibre en faveur des AGPI de la série n-6 (Figure 27 ; Annexes 1 et 2).

Chez les animaux recevant un régime supplémenté en DHA, on n'observe également aucune modification des concentrations tissulaires en phospholipides. Si la teneur en DHA n'est pas sensiblement modifiée, on note par contre une diminution significative de celle de l'AA (-25% dans la PC ; -27% pour les GPE et -15% pour la PS) ; de ce fait le rapport AA/DHA est diminué d'environ 30% (Figure 27 ; Annexes 1 et 2).

Comparativement au régime équilibré, les régimes déficient ou supplémenté ne provoquent aucune modification des teneurs en acides gras des autres familles majeures (saturés et monoinsaturés) (Annexes 1 et 2).

#### I.1.2. Hippocampe

Dans l'hippocampe des animaux témoins (régime équilibré), le profil des classes de phospholipides est comparable à celui du cortex, avec cependant une concentration tissulaire en PC plus faible d'environ 5% (Tableau 9). En ce qui concerne les concentrations en AGPI, l'hippocampe se distingue à la fois par sa plus grande richesse en AA liée à la PC, et par des moindres teneurs en DHA dans les 3 classes de phospholipides (Figure 28), plus particulièrement dans les GPE (-32% comparativement au cortex) et dans la PS (-17%).



**Figure 28 : Composition en AA, DPA n-6 et DHA des 3 classes de phospholipides (PC, GPE et PS) dans l'hippocampe des rats recevant un régime équilibré en AGPI n-6/n-3, déficient en n-3 ou supplémenté en DHA.** PC : phosphatidylcholine ; GPE : gly rophospholipides   éthanolamine ; PS : phosphatidylsérine. Les valeurs sont exprimées en  mol d'acides gras/ g de cortex sur la moyenne de 6 échantillons ( $\pm$ SD). ANOVA 1, post-test : Tukey test





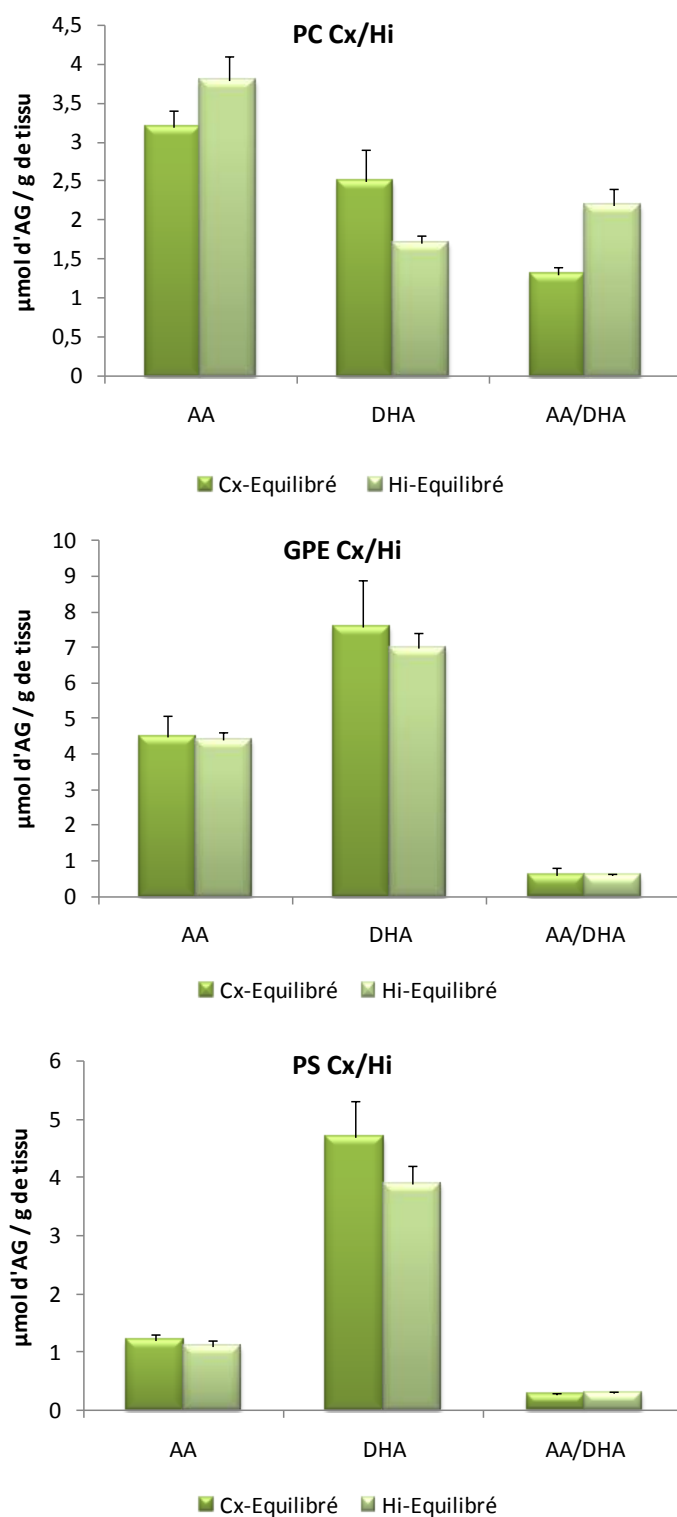
Comme dans le cas du cortex, l'apport alimentaire en AGPI n-3 n'a aucune incidence sur les concentrations en classes de phospholipides de l'hippocampe (Figure 26). En revanche, il modifie énormément le profil en acides gras de ces différentes classes. Pour le groupe de rats déficients comparés aux témoins, la diminution de la concentration de DHA est similaire à celle observée dans le cortex c'est-à-dire : -65% dans la PC, -60% dans les GPE et -54% dans la PS. Cette diminution est également compensée par une augmentation de la concentration en DPA n-6. A la différence du cortex, la déficience induit également une augmentation significative des concentrations en AA au niveau des 2 classes de phospholipides les plus riches en DHA, les GPE (+11%) et la PS (+27%)( Figure 28 ; Annexes 3 et 4). De ce fait, le déséquilibre en faveur des AGPI n-6 induit par la déficience est plus marqué dans l'hippocampe que dans le cortex.

Pour les rats recevant le régime supplémenté en DHA, on observe une augmentation des concentrations en DHA pour l'ensemble des classes de phospholipides de l'hippocampe, allant de +17% pour la PC et les GPE à +29% pour la PS (ces concentrations restaient inchangées dans le cortex). Cette augmentation s'accompagne d'une réduction des concentrations en AA avec cependant une amplitude moindre que celle constatée au niveau du cortex (-16 à -20%), de telle sorte que le rapport AA/DHA est encore plus bas chez les rats supplémentés que chez les témoins (Figure 28 ; Annexes 3 et 4).

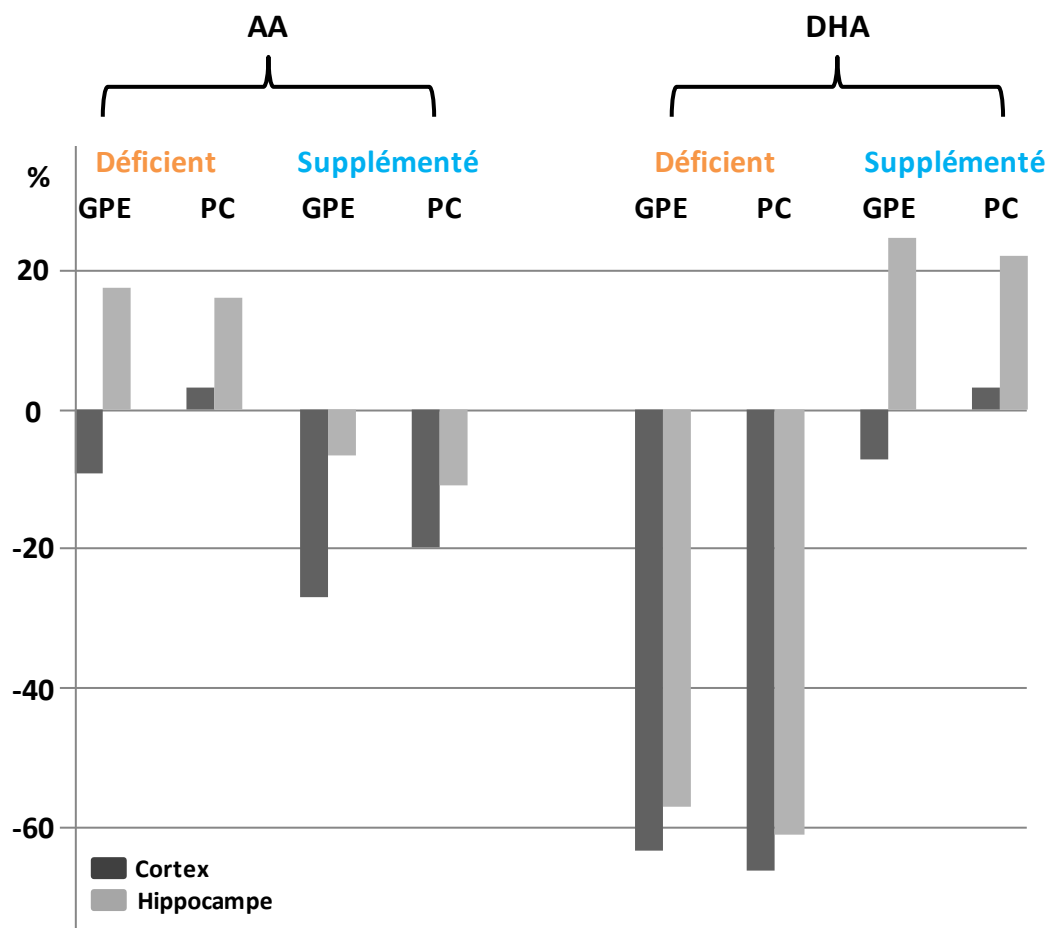
Comparativement au régime équilibré, la déficience ou la supplémentation n'affectent pas de façon appréciable les teneurs en acides gras des saturés et monoinsaturés (Annexes 3 et 4).

En conclusion, les deux zones cérébrales se distinguent par leur différence de concentrations et de profils en AGPI. De façon globale, l'hippocampe se caractérise à la fois par sa plus grande concentration en AA (PC) et sa plus faible teneur en DHA (PC, GPE et PS) (Figure 29). De plus, cette zone cérébrale se distingue par sa plus grande capacité à incorporer du DHA lorsqu'il est apporté directement par l'alimentation (rats supplémentés) tout en préservant des teneurs adéquates en AA (Figure 30), à l'inverse du cortex qui incorpore peu de DHA associé à une réduction significative de l'AA.





**Figure 29 : Comparaison des teneurs en DHA et AA dans le cortex et l'hippocampe chez les animaux recevant un régime équilibré.** PC : phosphatidylcholine ; GPE : glycérophospholipides à éthanamine ; PS : phosphatidylsérine. Les valeurs sont exprimées en  $\mu\text{mol d'acides gras} / \text{g de tissu}$  sur la moyenne de 6 échantillons ( $\pm\text{SD}$ ).



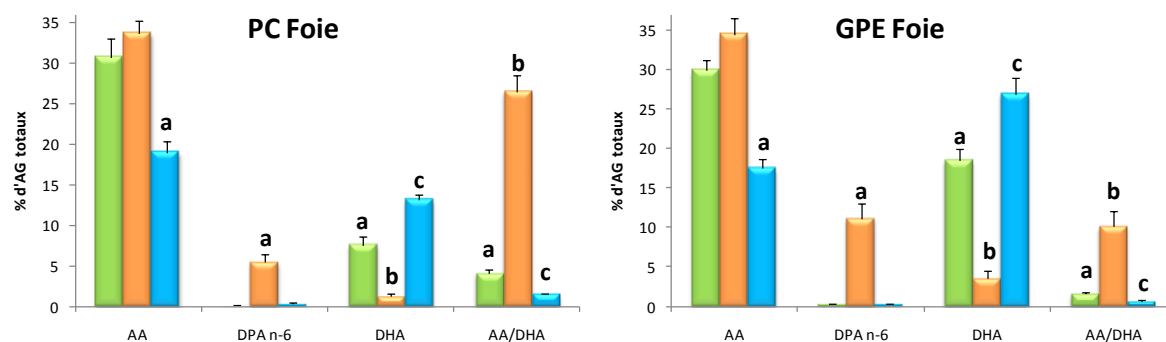
**Figure 30 : Comparaison des variations de teneur en DHA et en AA dans le cortex et l'hippocampe chez les rats déficients ou supplémentés.** Les résultats présentés sont exprimés en différence de pourcentage par rapport aux animaux équilibrés.

## I.2.Foie et plasma

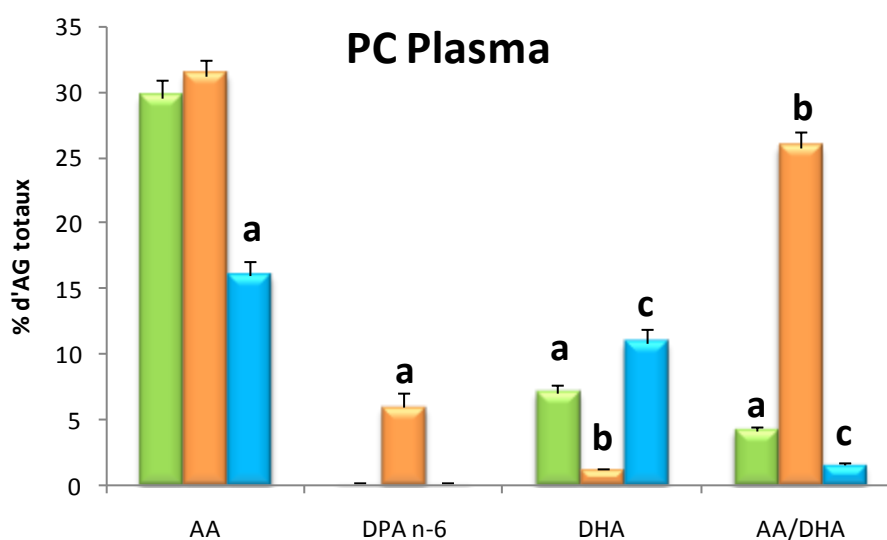
La composition en acides gras a été déterminée pour la PC et les GPE au niveau du foie et pour la PC au niveau du plasma, classes de phospholipides majoritairement retrouvées dans ces deux tissus. Chez les animaux témoins, on retrouve les caractéristiques de composition en acides gras des zones cérébrales. Les GPE renferment des teneurs en AGPI à longue chaîne des séries n-6 et n-3 plus élevées que celles de la PC.

Comparativement aux zones cérébrales, les différences liées à l'apport alimentaire en AGPI n-3 sont plus marquées dans les phospholipides du foie et du plasma. Ainsi chez les animaux déficients, la teneur en DHA est fortement diminuée, de 80% et 83% dans le foie et le plasma (Figures 31 et 32 ; Annexe 5). Par conséquent, le rapport AA/DHA est plus fortement augmenté dans le foie, avec des valeurs égales à 26,5 pour la PC et à 10,1 pour les GPE par rapport aux valeurs des animaux témoins 4,1 pour la PC et 1,6 pour les GPE (Figure 31 ; Annexe 5). On retrouve au niveau de la PC plasmatique des variations du même ordre.

En ce qui concerne les rats recevant un régime supplémenté en DHA, on observe une diminution de la teneur en AA (de 38% et 41% respectivement pour la PC et les GPE du foie, et de 46% au niveau du plasma). Cette diminution est associée à une augmentation marquée de la teneur en DHA pour ces 2 classes de phospholipides et ces 2 tissus (de 72% et 45% respectivement pour la PC et GPE du foie, et de 54% pour le plasma). Ainsi le rapport AA/DHA est diminué par la supplémentation d'un facteur 3 par rapport au régime témoin (Figure 31 et 32 ; Annexe 5). Chez ces animaux supplémentés, on observe en outre l'élévation de la teneur en acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5n-3), qui atteint 1% des acides gras totaux dans le plasma et plus de 2% dans le foie, tandis que cet AGPI n'est pas détectable dans les 2 zones cérébrales. Cette élévation significative dans les phospholipides du foie et du plasma résulte directement de la présence de l'EPA dans l'huile de thon.



**Figure 31 : Composition en AA, DPA n-6 et DHA des 2 classes phospholipides PC et GPE du foie chez des rats ayant reçu un régime équilibré en AGPI n-6/n-3, un régime déficient en AGPI n-3 et un régime supplémenté en DHA.** PC : phosphatidylcholine ; GPE : glycérophospholipides à éthanolamine. Les valeurs sont exprimées en % d'acides gras totaux sur la moyenne de 6 échantillons ( $\pm$ SD). ANOVA 1, post-test : Tukey test



**Figure 32: Composition en AA, DPA n-6 et DHA de la PS du plasma chez des rats ayant reçu un régime équilibré en AGPI n-6/n-3, un régime déficient en AGPI n-3 et un régime supplémenté en DHA.** PS : Phosphatidylsérine. Les valeurs sont exprimées en % d'acides gras totaux sur la moyenne de 6 échantillons ( $\pm$ SD). ANOVA 1, post-test : Tukey test

## **II. Expression génique des facteurs clés du métabolisme énergétique dans le cortex et la couche CA1 de l'hippocampe**

### **II.1. Comparaison du niveau d'expression des facteurs du métabolisme énergétique en fonction des zones cérébrales chez les rats équilibrés**

La comparaison des niveaux d'expression (abondance relative) des gènes du métabolisme énergétique dans l'hippocampe et le cortex suggère que ces 2 structures se distinguent fortement sur le plan de leur activité métabolique (Annexe 6). Cette comparaison a été réalisée chez les animaux témoins en comparant le niveau d'expression de chaque gène dans l'hippocampe à celui de son homologue dans le cortex (le cortex est utilisé ici comme référence ou « calibrateur » pour chacun des gènes).

Les résultats exposés dans le Tableau 10 mettent en évidence que toutes les étapes du métabolisme énergétique dépendent de la localisation cérébrale. Dans la majorité des cas, on observe dans la couche CA1 de l'hippocampe un niveau d'expression plus élevé de 19 à 83% selon les gènes. Cependant, quelques gènes exprimés dans l'hippocampe présentent un niveau d'expression moindre comparativement au cortex : MCT2 (-28%) ; Pfkfb3 (-17%) ; Glis (-43%) ; Cox6c (-28%) ; Atp5j (-24%) (Tableau 10).

### **II.2. Effet du statut en AGPI n-3 sur l'expression de gènes du métabolisme énergétique**

#### **II.2.1. Effet du régime déficient en AGPI n-3**

**Transporteurs du glucose.** Sur les 2 gènes codant pour les transporteurs GLUT1 (endothélial et astrocytaire) et GLUT3 (neuronal), seule l'expression de GLUT1 est altérée par la déficience, et ce au niveau du cortex fronto-pariétal. En effet, l'expression de GLUT1 est diminuée de 33% par rapport aux animaux témoins ( $p=0,05$ ). L'expression du transporteur neuronal, GLUT3, n'est pas modifiée par le régime (Tableau 11).

Au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe, aucune modification de l'expression des 2 transporteurs du glucose n'est observée (Tableau 12).



	N°Accession (GENBANK)	Gènes	Structures		Valeurs de <i>p</i>
			Cortex	CA1	
Transporteurs	NM_138827	GLUT1	1,00±0,15	<b>1,46±0,11</b>	0,003
	NM_017102	GLUT3	1,00±0,12	<b>1,30±0,07</b>	0,005
	NM_012716	MCT1	1,00±0,04	<b>1,33±0,03</b>	<0,001
	NM_017302	MCT2	1,00±0,14	<b>0,72±0,02</b>	0,007
	NM_001013913	MCT4	1,00±0,16	<b>1,33±0,13</b>	0,019
	NM_017215	GLT1	1,00±0,11	<b>1,19±0,05</b>	<0,05
	NM_019225	GLAST	1,00±0,15	0,98±0,10	
Na/K ATPase	NM_012505	Atp1a2	1,00±0,11	1,16±0,07	
	NM_012506	Atp1a3	1,00±0,16	<b>1,65±0,17</b>	0,001
Glycolyse	NM_012734	Hk1	1,00±0,09	0,87±0,10	
	NM_206847	Pfkip	1,00±0,11	<b>0,83±0,07</b>	0,044
	NM_031715	Pfkm	1,00±0,12	1,08±0,07	
	NM_207592	Gpi	1,00±0,04	1,02±0,05	
	NM_017008	GAPDH	1,00±0,09	0,91±0,11	
	NM_053291	Pgk1	1,00±0,13	<b>1,63±0,25</b>	0,004
	NM_001109908	Eno1	1,00±0,20	<b>1,35±0,13</b>	0,025
	NM_139325	Eno2	1,00±0,12	<b>1,44±0,12</b>	0,002
	NM_053297	Pkm2	1,00±0,16	1,18±0,12	
Glycogénèse	NM_017344	Gsk3a	1,00±0,12	<b>1,33±0,18</b>	0,021
	NM_032080	Gsk3b	1,00±0,11	<b>1,29±0,05</b>	0,003
Métabolisme du lactate	NM_017025	Ldha	1,00±0,24	<b>1,54±0,22</b>	<0,05
	NM_012595	Ldha	1,00±0,13	<b>1,18±0,03</b>	0,04
Métabolisme du pyruvate	NM_001004072	Pdha1	1,00±0,11	<b>1,44±0,05</b>	<0,001
	NM_001007620	Pdha1	1,00±0,25	<b>1,62±0,14</b>	0,004
Métabolisme du glutamate	NM_001109968	Gls	1,00±0,09	<b>0,57±0,04</b>	<0,001
	NM_017073	GluT	1,00±0,06	0,95±0,09	
Métabolisme mitochondrial	NM_012985	Ndufa5	1,00±0,07	<b>1,61±0,22</b>	<0,05
	NM_130428	Sdha	1,00±0,10	<b>1,38±0,04</b>	<0,001
	NM_001004250	Uqcrc1	1,00±0,12	0,95±0,08	
	NM_001006970	Uqcrc2	1,00±0,13	1,01±0,07	
	NM_019360	Cox6c	1,00±0,10	<b>0,72±0,05</b>	0,003
	NM_134345	Cox8a	1,00±0,14	1,38±0,30	
	NM_017311	Atp5g1	1,00±0,20	<b>1,32±0,11</b>	0,032
	NM_019383	Atp5h	1,00±0,10	<b>1,83±0,30</b>	<0,05
	NM_053602	Atp5j	1,00±0,16	<b>0,76±0,05</b>	0,028
	NM_139106	Atp5d	1,00±0,06	1,02±0,06	
	NM_134364	Atp5b	1,00±0,10	0,98±0,06	
	NM_138883	Atp5o	1,00±0,19	0,80±0,05	
Cycle de Krebs	NM_130755	Cs	1,00±0,14	<b>1,56±0,08</b>	<0,001
	NM_031551	Idh3g	1,00±0,17	0,93±0,07	
	NM_033235	Mdh1	1,00±0,05	1,04±0,09	
	NM_031151	Mdh2	1,00±0,14	0,84±0,08	
	NM_012600	Me1	1,00±0,19	1,22±0,24	

**Tableau 10 : Comparaison du niveau d'expression des gènes du métabolisme énergétique cérébral entre le cortex fronto-pariétal et la couche CA1 de l'hippocampe chez les animaux équilibrés.** Les valeurs sont rapportées par rapport à un calibrateur (cortex fronto-pariétal) et représentent une moyenne de 4 échantillons (±SEM). ANOVA2, Tukey Test. En rouge : augmentation de l'expression du gène ; en bleu : diminution de l'expression du gène.

**Glycolyse et voie du glycogène.** Chez les animaux déficients, aucun effet régime n'est observé sur l'expression des gènes clés de la glycolyse et de la voie du glycogène dans le cortex fronto-pariétal (Tableau 11).

En revanche, dans la couche CA1 de l'hippocampe, la glycolyse est perturbée avec une augmentation significative de l'expression de plusieurs gènes clés de cette voie métabolique. En effet l'expression de l'hexokinase 1 (Hk1) est augmentée de 68% ( $p < 0,001$ ), et celles de la phosphoglucoisomérase (Gpi) et de la GAPDH respectivement de 25% et 37% (avec  $p = 0,036$  et  $p = 0,019$ ). L'expression des autres enzymes étudiés de la glycolyse n'est pas modifiée (Tableau 12).

**Métabolisme du lactate.** Au niveau du cortex fronto-pariétal, la déficience ne modifie pas le métabolisme du lactate. En effet l'expression des transporteurs MCT (isoformes astrocytaires, MCT1 et MCT4, et neuronal, MCT2) ainsi que celle des 2 isoformes de la lactate deshydrogénase (LDH1 et LDH5) ne sont pas modifiées chez les animaux déficients (Tableau 11).

Dans la couche CA1 de l'hippocampe, seule l'expression du transporteur neuronal MCT2 est diminuée significativement de 38% ( $p = 0,003$ ). Les autres transporteurs de la famille des MCT et les 2 isoformes de la lactate deshydrogénase ne sont pas modifiés par le régime déficient (Tableau 12).

**Métabolisme du glutamate et la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase.** La déficience alimentaire en AGPI n-3 entraîne une modification du métabolisme du glutamate, au niveau cortical, qui se manifeste par une augmentation certes modérée mais très significative de l'expression de l'un des transporteurs du glutamate, GLT1 (18%,  $p = 0,001$ ). En revanche, les autres acteurs du métabolisme du glutamate, GLAST, la glutaminase (Glul) et la glutamine synthase (Gls), ne sont pas perturbés par la déficience. On observe que l'expression de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase est également perturbée avec une augmentation de la sous-unité Atp1a2 (26%,  $p = 0,031$ ) chez les animaux déficients (Tableau 11).

Au contraire du cortex fronto-pariétal, l'expression des deux transporteurs du glutamate est modifiée au niveau de la couche CA1. En effet, on observe une augmentation de 77 et 45%

pour GLUT1 et GLAST (respectivement avec  $p < 0,001$  et  $p = 0,013$ ). De plus l'expression de la glutamine synthase (Gls) est augmentée de 42% ( $p = 0,007$ ). En ce qui concerne la pompe

	Gènes	Régimes		Valeurs de $p$
		Déficient	Supplémenté	
Transporteurs	GLUT1	0,67 ± 0,06	0,99 ± 0,21	0,051
	GLUT3	0,87 ± 0,15	1,03 ± 0,19	
	MCT1	0,90 ± 0,12	1,05 ± 0,07	
	MCT4	0,87 ± 0,04	0,89 ± 0,07	
	MCT2	1,15 ± 0,13	1,45 ± 0,09	0,031
	GLT1	1,18 ± 0,04	1,12 ± 0,08	0,001 ; 0,025
	GLAST	1,04 ± 0,08	1,12 ± 0,02	
NaK ATPase	Atp1a2	1,26 ± 0,10	1,14 ± 0,15	0,031
	Atp1a3	1,12 ± 0,25	0,84 ± 0,20	
Glycolyse	Hk1	0,97 ± 0,12	1,14 ± 0,15	
	Pfkb	0,99 ± 0,09	0,96 ± 0,07	
	Pfkm	1,19 ± 0,08	1,10 ± 0,13	
	Gpi	1,03 ± 0,11	1,15 ± 0,14	
	GAPDH	1,05 ± 0,18	1,10 ± 0,21	
	Pgk1	0,87 ± 0,12	1,00 ± 0,17	
	Eno1	0,82 ± 0,15	0,86 ± 0,14	
	Eno2	1,04 ± 0,16	1,09 ± 0,25	
	Pkm2	0,85 ± 0,12	0,86 ± 0,19	
Glycogénèse	Gsk3a	0,94 ± 0,12	0,98 ± 0,14	
	Gsk3b	0,81 ± 0,12	1,09 ± 0,15	
Métabolisme du lactate	Ldha	0,81 ± 0,20	0,84 ± 0,16	
	Ldhb	1,22 ± 0,16	1,21 ± 0,24	
Métabolisme du pyruvate	Pdha1	0,84 ± 0,08	1,22 ± 0,16	0,057
	Pdha2	0,94 ± 0,16	1,11 ± 0,19	
Métabolisme du glutamate	Gls	1,04 ± 0,11	1,16 ± 0,21	
	Glul	1,00 ± 0,05	0,95 ± 0,05	
Métabolisme mitochondrial	Ndufa5	1,04 ± 0,10	1,15 ± 0,22	
	Sdha	1,15 ± 0,08	1,36 ± 0,16	0,002
	Uqcrc 1	1,26 ± 0,26	1,22 ± 0,18	
	Uqcrc 2	1,36 ± 0,45	1,40 ± 0,21	
	Cox6c	0,85 ± 0,04	1,17 ± 0,16	
	Cox8a	0,98 ± 0,15	1,16 ± 0,21	
	Atp5g1	0,97 ± 0,24	1,20 ± 0,20	
	Atp5h	1,09 ± 0,11	1,27 ± 0,22	
	Atp5j	0,97 ± 0,12	1,14 ± 0,18	
	Atp5d	1,13 ± 0,09	0,86 ± 0,13	
	Atp5b	0,78 ± 0,13	1,19 ± 0,22	0,04
	Atp5o	0,91 ± 0,13	1,16 ± 0,23	
Cycle de Krebs	Cs	1,01 ± 0,14	1,00 ± 0,18	
	Idh3g	1,16 ± 0,05	1,25 ± 0,13	0,022
	Mdh1	0,94 ± 0,15	1,03 ± 0,17	
	Mdh2	0,90 ± 0,04	0,76 ± 0,11	0,010
	Me1	1,12 ± 0,10	1,07 ± 0,21	

**Tableau 11 : Effet d'une déficience en AGPI n-3 ou d'une supplémentation en AGPI n-3 longue chaîne sur l'expression des gènes du métabolisme énergétique dans le cortex fronto-pariétal.** Les valeurs sont rapportées par rapport à un calibrateur (régime équilibré) et représentent

une moyenne de 4 échantillons ( $\pm$ SEM). ANOVA2, Tukey test. En rouge : augmentation de l'expression du gène ; en bleu : diminution de l'expression du gène.

	Gènes	Régimes		Valeurs dep
		Déficient	Supplémenté	
Transporteurs	GLUT1	0,93 $\pm$ 0,06	1,15 $\pm$ 0,19	
	GLUT3	0,95 $\pm$ 0,19	1,12 $\pm$ 0,12	
	MCT1	1,14 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,12	
	MCT4	1,06 $\pm$ 0,18	1,07 $\pm$ 0,26	
	MCT2	0,62 $\pm$ 0,06	1,13 $\pm$ 0,22	0,003
	GLT1	1,77 $\pm$ 0,17	1,03 $\pm$ 0,09	<0,001
	GLAST	1,45 $\pm$ 0,17	1,86 $\pm$ 0,18	0,013 ; <0,001
NaK ATPase	Atp1a2	0,95 $\pm$ 0,08	1,01 $\pm$ 0,09	
	Atp1a3	1,38 $\pm$ 0,18	1,23 $\pm$ 0,27	0,04
Glycolyse	Hk1	1,68 $\pm$ 0,14	1,44 $\pm$ 0,14	<0,001 ; 0,001
	Pfkip	1,21 $\pm$ 0,14	1,02 $\pm$ 0,14	
	Pfkm	1,02 $\pm$ 0,08	1,00 $\pm$ 0,11	
	Gpi	1,25 $\pm$ 0,18	1,00 $\pm$ 0,09	0,036
	GAPDH	1,37 $\pm$ 0,14	1,59 $\pm$ 0,20	0,019 ; <0,001
	Pgk1	0,91 $\pm$ 0,08	0,88 $\pm$ 0,13	
	Eno1	1,00 $\pm$ 0,15	1,05 $\pm$ 0,18	
	Eno2	1,25 $\pm$ 0,14	1,03 $\pm$ 0,20	
	Pkm2	1,02 $\pm$ 0,15	1,06 $\pm$ 0,14	
Glycogénèse	Gsk3a	0,91 $\pm$ 0,11	0,83 $\pm$ 0,08	
	Gsk3b	1,03 $\pm$ 0,08	1,03 $\pm$ 0,14	
Métabolisme du lactate	Ldha	0,97 $\pm$ 0,17	0,85 $\pm$ 0,15	
	Ldhb	1,06 $\pm$ 0,10	1,01 $\pm$ 0,11	
Métabolisme du pyruvate	Pdha1	0,98 $\pm$ 0,08	1,04 $\pm$ 0,13	
	Pdhb	1,02 $\pm$ 0,13	0,97 $\pm$ 0,13	
Métabolisme du glutamate	Gls	1,42 $\pm$ 0,17	1,37 $\pm$ 0,20	0,007 ; 0,018
	Glul	1,03 $\pm$ 0,11	1,06 $\pm$ 0,15	
Métabolisme mitochondrial	Ndufa5	1,01 $\pm$ 0,14	1,09 $\pm$ 0,19	
	Sdha	1,09 $\pm$ 0,09	1,01 $\pm$ 0,11	
	Uqcrc 1	1,05 $\pm$ 0,09	0,99 $\pm$ 0,17	
	Uqcrc 2	1,18 $\pm$ 0,13	1,81 $\pm$ 0,23	<0,001
	Cox6c	1,95 $\pm$ 0,17	1,92 $\pm$ 0,19	<0,001
	Cox8a	0,86 $\pm$ 0,15	0,76 $\pm$ 0,10	
	Atp5g1	1,03 $\pm$ 0,11	0,95 $\pm$ 0,16	
	Atp5h	0,87 $\pm$ 0,12	0,80 $\pm$ 0,15	
	Atp5j	1,82 $\pm$ 0,17	1,85 $\pm$ 0,18	<0,001
	Atp5d	1,04 $\pm$ 0,09	1,04 $\pm$ 0,18	
	Atp5b	1,10 $\pm$ 0,12	0,98 $\pm$ 0,06	
	Atp5o	1,08 $\pm$ 0,17	1,64 $\pm$ 0,24	<0,001
Cycle de Krebs	Cs	1,07 $\pm$ 0,10	1,06 $\pm$ 0,12	
	Idh3g	1,01 $\pm$ 0,08	1,01 $\pm$ 0,18	
	Mdh1	1,23 $\pm$ 0,16	1,40 $\pm$ 0,24	0,014
	Mdh2	1,71 $\pm$ 0,12	1,89 $\pm$ 0,31	<0,001
	Me1	0,98 $\pm$ 0,18	1,25 $\pm$ 0,15	

**Tableau 12 : Effet d'une déficience en AGPI n-3 ou d'une supplémentation en AGPI n-3 longue chaîne sur l'expression des gènes du métabolisme énergétique dans la couche CA1 de l'hippocampe.** Les valeurs sont rapportées par rapport à un calibrateur (régime équilibré) et

représentent une moyenne de 4 échantillons ( $\pm$ SEM). ANOVA2, Tukey test. En rouge : augmentation de l'expression du gène ; en bleu : diminution de l'expression du gène.

$\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, une sous-unité différente de celle qui est modifiée au niveau du cortex, l'Atp1a3, présente une augmentation de son expression de 38% ( $p=0,04$ ) (Tableau 12).

**Métabolisme du pyruvate et cycle de Krebs.** Seule l'expression de Mdh2 (cycle de Krebs) est augmentée de 71% ( $p<0,001$ ), et uniquement dans la couche CA1 de l'hippocampe des animaux déficients en AGPI n-3. Les autres enzymes de ce cycle ainsi que du métabolisme du pyruvate ne présentent pas de modification de leurs expressions géniques (Tableaux 11 et 12).

**Phosphorylation oxydative** Sur les 5 complexes constituant la voie mitochondriale de la phosphorylation oxydative, seule l'ATP synthase (complexe V) voit son expression modifiée au niveau du cortex par la déficience en AGPI n-3. Elle se traduit par une diminution (22%,  $p=0,04$ ) de l'expression de la sous unité Atp5b, qui fait partie du complexe catalytique F1 de l'ATP synthase (Tableau 11).

Au niveau de la couche CA1, le complexe V de la phosphorylation oxydative est également perturbé mais cette fois par une augmentation significative de 82% ( $p<0,001$ ) de l'expression de la sous unité Atp5j (complexe Fo de l'ATP synthase). De plus dans cette zone cérébrale, le complexe IV est également touché avec une augmentation significative et marquée de l'expression de la sous unité Cox6c de 95% ( $p<0,001$ ) (Tableau 12).

Les différents effets provoqués par la déficience en AGPI n-3 sur l'expression des gènes du métabolisme énergétique sont illustrés dans les figures 38 (p 123) et 40 (p 125) pour le cortex fronto-pariétal et la couche CA1 de l'hippocampe, respectivement.

## II.2.2. Effet d'un régime supplémenté en DHA

**Transporteurs du glucose, glycolyse et voie du glycogène.** Il n'y a pas d'effet du régime supplémenté en DHA sur le niveau d'expression des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3 par rapport au régime témoin dans les 2 structures cérébrales, ni sur celui des enzymes de la glycolyse ou de la synthèse du glycogène. Cependant dans la couche CA1, nous observons une surexpression de l'Hexokinase (+44%,  $p=0,001$ ) et de la GAPDH (+59%,  $p<0,001$ ) (Tableaux 11 et 12).

**Métabolisme du lactate.** Au niveau du cortex fronto-pariétal, l'expression du gène codant pour le transporteur MCT2 est significativement augmentée de 45% ( $p=0,031$ ) par une supplémentation en DHA. Par contre l'expression des isoformes astrocytaires des transporteurs MCT (MCT1 et 4) et de la lactate deshydrogénase (isoformes astrocytaire et neuronale) n'est pas modifiée (Tableau 11).

Dans la couche CA1, la supplémentation en DHA n'a aucun effet sur l'ensemble des acteurs du métabolisme du lactate, les transporteurs MCT et la lactate deshydrogénase (Tableau 12).

**Métabolisme du glutamate et pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase.** Dans le cortex fronto-pariétal, le métabolisme du glutamate est semble-t-il perturbé par la supplémentation en DHA puisqu'elle se traduit par une augmentation significative, mais relativement modérée en amplitude, de l'expression de l'un des 2 transporteurs du glutamate, GLT1 (12%,  $p=0,025$ ). L'autre transporteur, GLAST, ainsi que la glutaminase (Glul) et la glutamine synthase (Gls) ne présentent pas de modifications de leur niveau d'expression. La pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase ne voit pas son expression perturbée par le régime dans cette structure (Tableau 11).

Au contraire du cortex fronto-pariétal, seul le transporteur GLAST voit son expression augmentée de 86% ( $p<0,001$ ) avec la supplémentation dans la couche CA1. De plus, l'expression de la glutamine synthase (Gls) est également augmentée (+37%,  $p=0,018$ ) chez ces animaux. Comme pour le cortex fronto-pariétal, la supplémentation n'a pas d'effet sur l'expression des sous-unités de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Tableau 12).

**Métabolisme du pyruvate et cycle de Krebs.** Chez les rats supplémentés en DHA, l'expression de la pyruvate deshydrogénase (Pdha1) est augmentée de 22% dans le cortex fronto-pariétal ( $p=0,057$ ). Le cycle de Krebs est également touché avec l'augmentation de 25% ( $p=0,022$ ) de l'expression de l'isocitrate deshydrogénase (Idh3g) et avec la diminution de 24% de celle de la Mdh2 ( $p=0,01$ ) (Tableau 11).

Au niveau de la couche CA1, seul le cycle de Krebs est perturbé avec la forte augmentation de l'expression des 2 isoformes de la malate deshydrogénase, Mdh1 et Mdh2 (40% et 89% respectivement avec  $p=0,014$  et  $p<0,001$ ). Les autres enzymes de ce cycle, telle que la pyruvate deshydrogénase, ne présentent pas de modification de leur niveau d'expression (Tableau 12).

**Phosphorylation oxydative.** Seule l'expression de la Sdha (complexe II) est augmentée (36%,  $p=0,002$ ) au niveau cortical. Les autres facteurs de cette voie ne présentent pas de modification de leur expression (Tableau 11).

En revanche au niveau de la CA1, la supplémentation perturbe trois complexes de la voie de phosphorylation oxydative : le complexe III avec l'augmentation de 81% ( $p<0,001$ ) de l'expression d'Uqcrc2, le complexe IV avec l'augmentation de 92% ( $p<0,001$ ) de l'expression de la Cox6c et le complexe V avec les augmentations de 85% et 64% de l'Atp5j et de l'Atp5o (Tableau 12).

Les différents effets provoqués par la supplémentation en DHA sur l'expression des gènes du métabolisme énergétique sont illustrés dans les figures 39 (p 124) et 41 (p 126) pour le cortex fronto-pariétal et la couche CA1 de l'hippocampe, respectivement.

### **II.3. Effet de l'activation sur l'expression des gènes du métabolisme énergétique**

L'activation a une faible incidence sur l'expression de l'ensemble des gènes étudiés du métabolisme énergétique étudiés. Cependant l'analyse statistique ANOVA2 a permis de mettre en évidence pour un certain nombre d'entre eux un effet global de l'activation. En particulier, nous mettons en évidence que l'expression de GLUT1 qui est la seule qui réponde à l'activation dans les 2 structures (avec  $p=0,023$  dans le cortex fronto-pariétal et  $p=0,002$  dans la couche CA1, tous régimes confondus). On observe également un effet global pour d'autres gènes dans le cortex fronto-pariétal : Atp1a3 avec  $p=0,058$  ; GAPDH avec  $p=0,040$  et Pgk1 avec  $p=0,052$  (Tableau 10).

Dans un deuxième temps, l'ANOVA1 a permis la comparaison des effets de l'activation chez les animaux témoins, déficients ou supplémentés par rapport à leurs homologues restés au repos, comme présentés ci-dessous.

#### **II.3.1. Rats témoins**

Au niveau du cortex fronto-pariétal, 2 voies du métabolisme énergétique sont perturbées par l'activation neuronale. En premier lieu, nous observons une diminution identique de l'expression de plusieurs gènes de la glycolyse : Hk1 (+20%), Pfkp (+21%) et Gpi (+24%). L'expression des autres gènes de la glycolyse, ainsi que de ceux intervenant dans le

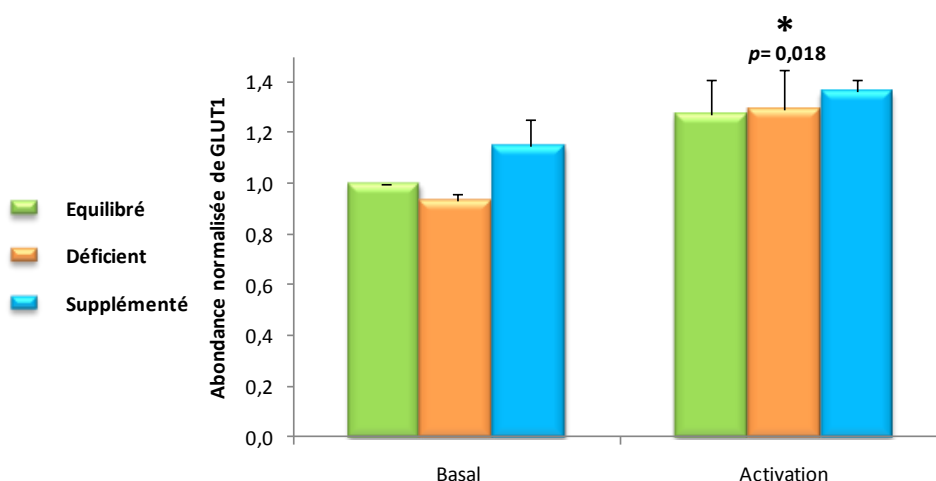
cycle du glycogène, n'est pas modifiée par l'état d'activation. De plus, un effet de l'activation neuronale est mis en évidence au niveau de la phosphorylation oxydative, avec une diminution de 24% de l'expression de la Cox6c et la Cox8a du complexe IV. En ce qui concerne les transporteurs et les autres voies, nous n'observons pas d'effet de l'activation sur leur niveau d'expression dans le cortex fronto-pariétal (Tableau 13).

La couche CA1 de l'hippocampe se différencie du cortex par l'absence d'effet de l'activation sur l'expression de l'ensemble des gènes du métabolisme énergétique cérébral sélectionnés dans cette étude (Tableau 13).



	N°Accession (GENBANK)	Gènes	Basal		Activation			Valeurs de <i>p</i>
			Déficient	Supplémenté	Equilibré	Déficient	Supplémenté	
Transporteurs	NM_138827	GLUT1	0,67±0,06	NS	NS	0,93±0,06	NS	0,056
Glycolyse	NM_012734	Hk1	NS	NS	0,80±0,06	NS	NS	0,035
	NM_206847	Pfkb	NS	NS	0,79±0,04	NS	NS	0,018
	NM_207592	Gpi	NS	NS	0,76±0,05	NS	NS	0,007
Métabolisme mitochondrial	NM_019360	Cox6c	NS	NS	0,76±0,05	NS	NS	0,040
	NM_134345	Cox8a	NS	NS	0,76±0,05	NS	NS	0,015

**Tableau 13 : Effet d'une activation neuronale pour les 3 régimes expérimentaux sur l'expression des gènes du métabolisme énergétique au niveau du cortex fronto-pariétal.** Les valeurs sont rapportées par rapport à un calibrateur (le régime équilibré) et représentent une moyenne de 4 échantillons (±SEM). ANOVA2, post-test : Tukey. Les couleurs rouge et bleue représentent les variations d'expression de la condition activée par rapport à la condition basale pour chaque régime expérimental (augmentation et diminution, respectivement).



**Figure 33 : Effet d'une activation neuronale pour les rats des 3 régimes expérimentaux sur l'expression de GLUT1 au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe.** Les valeurs sont rapportées par rapport à un calibrateur (le régime équilibré) et représentent une moyenne de 4 échantillons (±SEM). ANOVA2, post-test : Tukey. Seul le groupe déficient (orange) présente un effet de l'activation (\* avec  $p=0,018$ ). Mais par contre, l'analyse statistique fait ressortir un effet global significatif de l'activation avec  $p=0,002$ . Dans cette zone, il n'y a pas d'effet de l'activation sur l'expression des autres gènes du métabolisme énergétique.

### II.3.2. Rats déficients

Chez les rats recevant le régime déficient en AGPI n-3, seule l'expression de GLUT1 est sensible à l'activation avec une augmentation de 26% dans le cortex fronto-pariétal et de 36% dans la couche CA1 de l'hippocampe (Tableau 13 et Figure 33). Les autres acteurs du métabolisme énergétique cérébral ne sont pas modifiés par l'activation.

### II.3.3. Rats supplémentés

Aucun effet de l'activation n'est observé sur les différentes étapes clés du métabolisme énergétique cérébral chez ces animaux et cela au niveau des 2 structures cérébrales de notre étude (Tableau 13).

En conclusion de cette partie, nous démontrons que la déficience et la supplémentation en AGPI n-3 modifient la réponse à l'activation neuronale, en supprimant la variation d'expression des gènes de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative observée dans le groupe témoin. En outre, la mise en environnement enrichi, induit uniquement chez les animaux déficients une augmentation de l'expression de GLUT1 dans les 2 structures étudiées.

L'expression génique de GLUT1, élément régulateur du métabolisme énergétique est modifiée par le statut en AGPI n-3 et en fonction de l'état d'activation. A la lumière de cette donnée, nous avons donc choisi d'investiguer sur l'expression protéique de ce transporteur et de le comparer à celle de MCT2, l'isoforme neuronale d'un des transporteurs de lactate, qui voit son expression génique également modulée par l'apport d'AGPI n-3.

## **III. Expression protéique des transporteurs GLUT1 et MCT2**

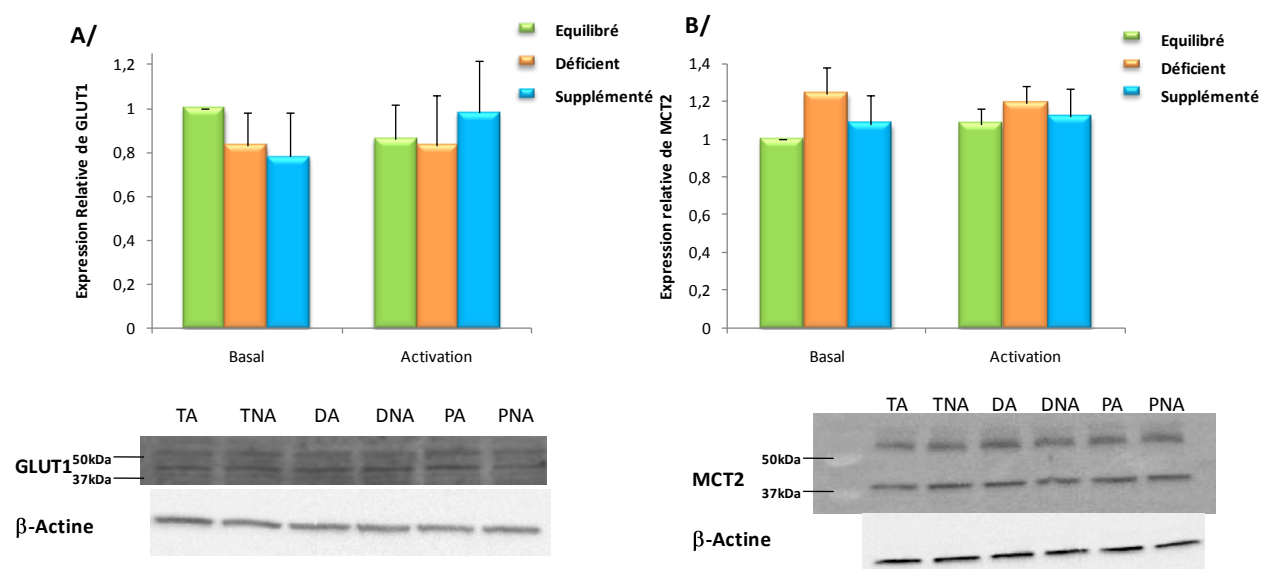
L'analyse par Western Blot a été réalisée dans chaque groupe de régime (équilibrés, déficients, supplémentés) et pour chaque état (repos, situation d'activation) c'est-à-dire pour 6 groupes au total, avec n=3 par groupe. L'expression protéique des transporteurs GLUT1 et MCT2 de chaque groupe est rapportée à celle de la  $\beta$ -actine (expression relative)

puis normalisée par rapport à l'expression relative mesurée chez les animaux témoins laissés au repos.

**Effet de l'apport alimentaire en AGPI n-3.** La déficience en AGPI n-3 et la supplémentation en DHA ne modifient pas l'expression de la protéine GLUT1-45kDa du cortex fronto-pariétal. L'isoforme 55kDa peut également être détectée dans ces échantillons, sans effet du régime. L'expression protéique du transporteur de lactate, MCT2 n'est également pas modifiée par le régime alimentaire des animaux (Figure 34).

En ce qui concerne la couche CA1 de l'hippocampe, on trouve des résultats similaires pour GLUT1 45kDa, et avec un faible signal (non quantifiable) au niveau de la bande représentant l'isoforme 55kDa.

**Effet de l'activation.** Le fait de mettre les animaux en situation d'activation ne modifie pas l'expression protéique des transporteurs de glucose et de lactate, GLUT1 et MCT2, dans les 2 structures (Figure 34).



**Figure 34 : Effet d'un apport alimentaire en AGPI n-3 et d'une activation sur l'expression protéique des transporteurs : A/ GLUT1 (45 kDa) et B/ MCT2 au niveau du cortex fronto-pariétal.** L'expression de GLUT1 et MCT2 de chaque groupe est rapportée à celle de la  $\beta$ -actine et est normalisée à l'expression obtenue chez les équilibrés non activés. Les résultats sont la moyenne de 3 échantillons passés 3 fois en Western Blot.

## **2<sup>ème</sup> Partie**

# **Impact de la déficience en AGPI n-3 sur la cinétique d'utilisation cérébrale du [<sup>18</sup>F] 2-déoxyglucose (FDG) mesurée par imagerie TEP**

## **I. Analyse du statut lipidique des animaux**

Pour notre étude d'imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positons) menée au Québec, le statut en AGPI n-3 des 2 groupes de rats (témoins et déficients) a été déterminé. En effet, cette analyse nous a semblé nécessaire afin de valider le protocole expérimental mis en place au CRC de Sherbrooke étant donné que les régimes ont été expédiés depuis la France (potentielle dégradation des AGPI à écarter) et que l'utilisation de ce type de protocole et de régimes expérimentaux était inhabituelle dans la structure animalière. Il fallait notamment s'assurer à posteriori que chaque groupe avait bien reçu le régime correspondant. Comme dans l'étude précédente, les analyses ont été effectuées sur les 2 zones cérébrales d'intérêt (Cortex et Hippocampe) et sur le foie et le plasma. Les animaux équilibrés et déficients présentent le même profil de teneur en acides gras que précédemment montré (Tableau 14 ; cf. Partie A/paragraphe I). Ainsi chez les animaux déficients en AGPI n-3, on observe notamment une diminution de la teneur en DHA comprise entre 60% (phospholipides des 2 structures cérébrales) et 80% (phospholipides du foie et du plasma), diminution en tout point comparable à celle mise en évidence pour l'étude de l'expression génique.

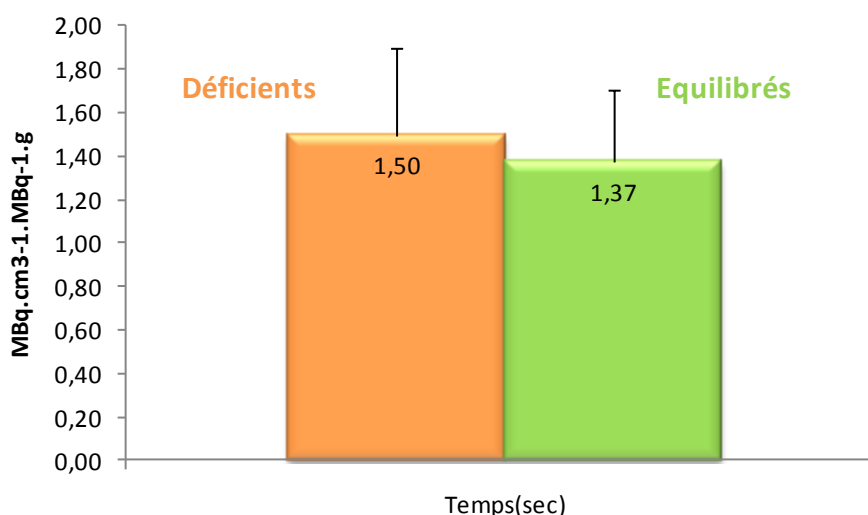
## **II. Utilisation cérébrale de glucose et Imagerie TEP**

### **II.1. Chez les animaux en situation d'activation**

Les animaux sont mis en activation selon le protocole exposé dans la partie matériel et méthode (paragraphe 7). Les mesures d'utilisation du FDG, exprimées en SUV (*Standardized Uptake Value*), sont prises sur le cerveau total de 6 animaux pour chaque régime (équilibré et déficient). En situation d'activation, nos données ne mettent pas en évidence de différence significative du niveau d'utilisation cérébrale de FDG entre les 2 groupes d'animaux (Figure 35).

Acides Gras	Equilibrés		Déficients	
	PC	GPE	PC	GPE
<b>Cortex</b>				
AA	6,1 ± 0,2	12,6 ± 0,7	6,2 ± 0,2	13,8 ± 0,9
DPA n-6	0,1 ± 0,04	0,5 ± 0,05	2,8 ± 0,1	12,8 ± 0,5
DHA	4,7 ± 0,2	23,6 ± 1,8	2,1 ± 0,1	10,7 ± 0,3
AA/DHA	1,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	3,0 ± 0,1	1,3 ± 0,1
<b>Hippocampe</b>				
AA	8,7 ± 0,6	15,5 ± 1,0	9,2 ± 0,5	15,9 ± 1,4
DPA n-6	0,1 ± 0,01	0,6 ± 0,04	2,5 ± 0,1	11,9 ± 1,0
DHA	3,7 ± 0,2	23,0 ± 1,4	1,8 ± 0,1	10,4 ± 0,4
AA/DHA	2,4 ± 0,2	0,7 ± 0,02	5,2 ± 0,5	1,5 ± 0,1
<b>Foie</b>				
AA	23,4 ± 4,6	22,8 ± 3,8	33,3 ± 1,2	31,5 ± 2,5
DPA n-6	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,2	5,7 ± 1,6	12,2 ± 2,7
DHA	8,1 ± 2,2	18,9 ± 3,5	1,4 ± 0,2	3,7 ± 0,4
AA/DHA	3,1 ± 0,8	1,2 ± 0,1	23,3 ± 2,3	8,5 ± 0,8
<b>Plasma</b>				
AA	21,2 ± 3,6	-	29,6 ± 2,3	-
DPA n-6	0,2 ± 0,1	-	5,4 ± 1,4	-
DHA	7,4 ± 0,7	-	1,3 ± 0,2	-
AA/DHA	2,9 ± 0,3	-	23,0 ± 2,4	-

**Tableau 14 : Comparaison des compositions lipidiques du cortex, de l'hippocampe, du foie et du plasma d'animaux recevant un régime équilibré en AGPI n-6/n-3 ou un régime déficient en AGPI n-3.** PC : phosphatidylcholine ; GPE : glycérophospholipides à éthanolamine. Les valeurs sont exprimées en % d'acides gras totaux et représentent une moyenne de 5 échantillons (±SD).



**Figure 35 : Effet d'une déficience en AGPI n-3 sur l'utilisation du <sup>18</sup>FDG chez des animaux en situation d'activation.** La mesure d'activité dans le cerveau total est exprimée en SUV (*Standardized Uptake Value*) et représente une moyenne de 4 animaux déficients et de 5 animaux témoins (±SD). Il n'y a pas de différence entre les 2 groupes d'animaux.

## II.2. Chez les animaux au repos

Les animaux, après le protocole d'activation, vont subir une seconde expérimentation afin de mesurer la cinétique d'utilisation cérébrale du FDG. Les animaux déficients en AGPI n-3 présentent une cinétique différente de celle des animaux recevant un régime équilibré (Figure 36). Tout d'abord, la courbe de cinétique souligne une vitesse d'utilisation plus faible chez ces animaux au cours des 80 premières secondes suivant l'injection du radiotraceur. Par ailleurs, le plateau d'incorporation maximale du FDG (SUV Max) reste inférieur chez les animaux déficients pour la période étudiée, soit 45 minutes après l'injection du FDG. Il apparaît de plus que le SUV Max n'atteint pas vraiment de plateau, les valeurs continuant d'augmenter dans ce groupe sans réellement se stabiliser au bout des 45 minutes (Figure 36).

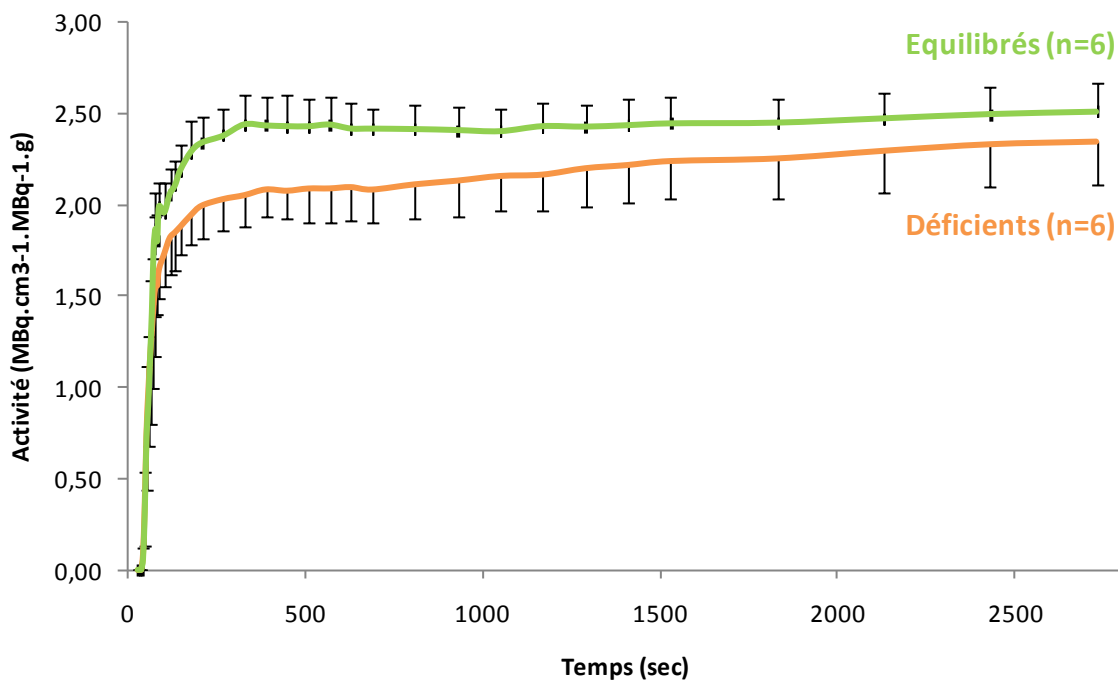
Afin de déterminer les paramètres de cette cinétique et donner des valeurs quantifiables pour comparer statistiquement les 2 groupes d'animaux, la vitesse d'utilisation du FDG a été calculée au cours des 80 premières secondes suivant l'injection du radiotraceur, par linéarisation (Figure 37). Les données de calcul montrent une réduction de 27% de la vitesse d'entrée du FDG chez les animaux déficients comparativement aux animaux équilibrés (Tableau 15). Enfin compte tenu du fait que la cinétique rapportée pour les animaux déficients ne permet pas de mesurer directement la valeur plateau d'incorporation du FDG, les données ont été exprimées en double inverse pour linéariser la cinétique et calculer par extrapolation la valeur plateau (Alessandri *et al.*, 2003) tel que défini par l'équation :

$$Y = Y_0 + a \cdot x \quad \text{avec } Y = 1/\text{SUV}, Y_0 = 1/\text{SUVMax} \text{ et } x = 1/\text{temps}.$$

Lorsque la valeur « temps » tend vers l'infini et que  $1/x$  est donc de 0, la valeur  $Y_0$  ( $1/\text{SUVMax}$ ) est directement donnée par l'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées, permettant ainsi de calculer le SUVMax (Figure 37). L'utilisation de ce mode de linéarisation permet de montrer que la valeur plateau d'utilisation du FDG est significativement réduite chez les animaux déficients en AGPI n-3 comparativement aux animaux équilibrés (Tableau 15).

### III. Expression protéique du transporteur de glucose GLUT1

Seule l'expression du transporteur de glucose, GLUT1, a été analysée dans cette étude, les mesures ayant été réalisées par Western Blot sur des échantillons de cortex fronto-pariétal et de couche CA1 d'hippocampe chez des animaux équilibrés et déficients en AGPI n-3, au repos. Comme dans l'étude précédente, les résultats ne mettent pas en évidence de différence significative entre les 2 groupes d'animaux au niveau des 2 structures (résultats non montrés).

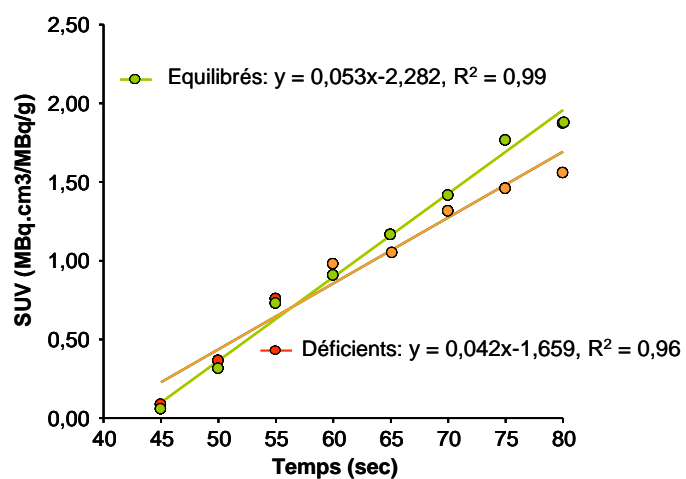


**Figure 36 : Effet d'une déficience en AGPI n-3 sur l'utilisation du  $^{18}\text{F}$ FDG chez des animaux en situation basale sur 45 minutes.** La mesure d'activité dans le cerveau total est exprimée en SUV (*Standardized Uptake Value*) et représente une moyenne de 6 animaux dans chaque groupe ( $\pm$ SD).





A - Linéarisation de la cinétique d'utilisation du FDG au cours des 80 secondes suivant l'injection du traceur



B – Linéarisation de la cinétique d'utilisation du FDG en double inverse

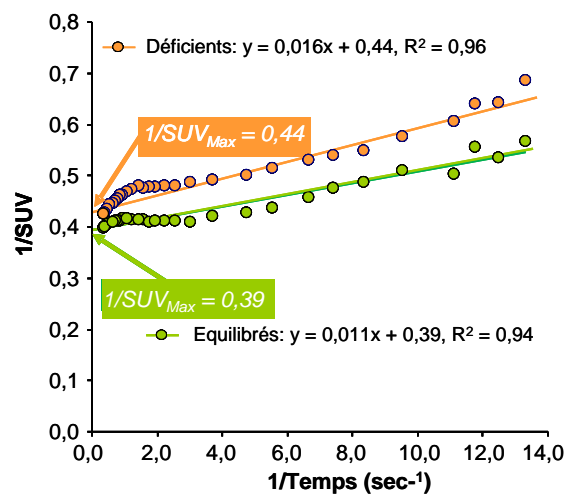
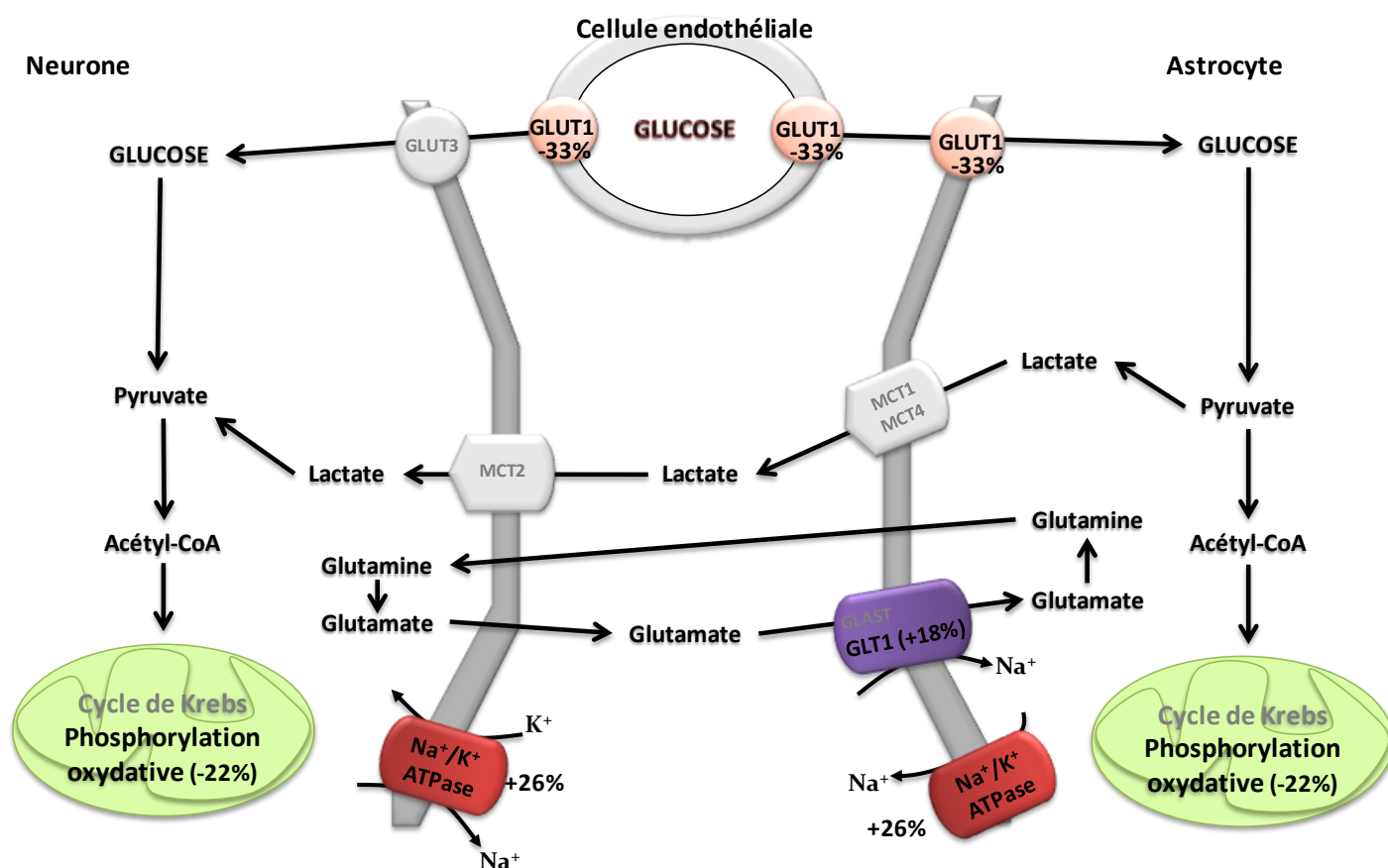


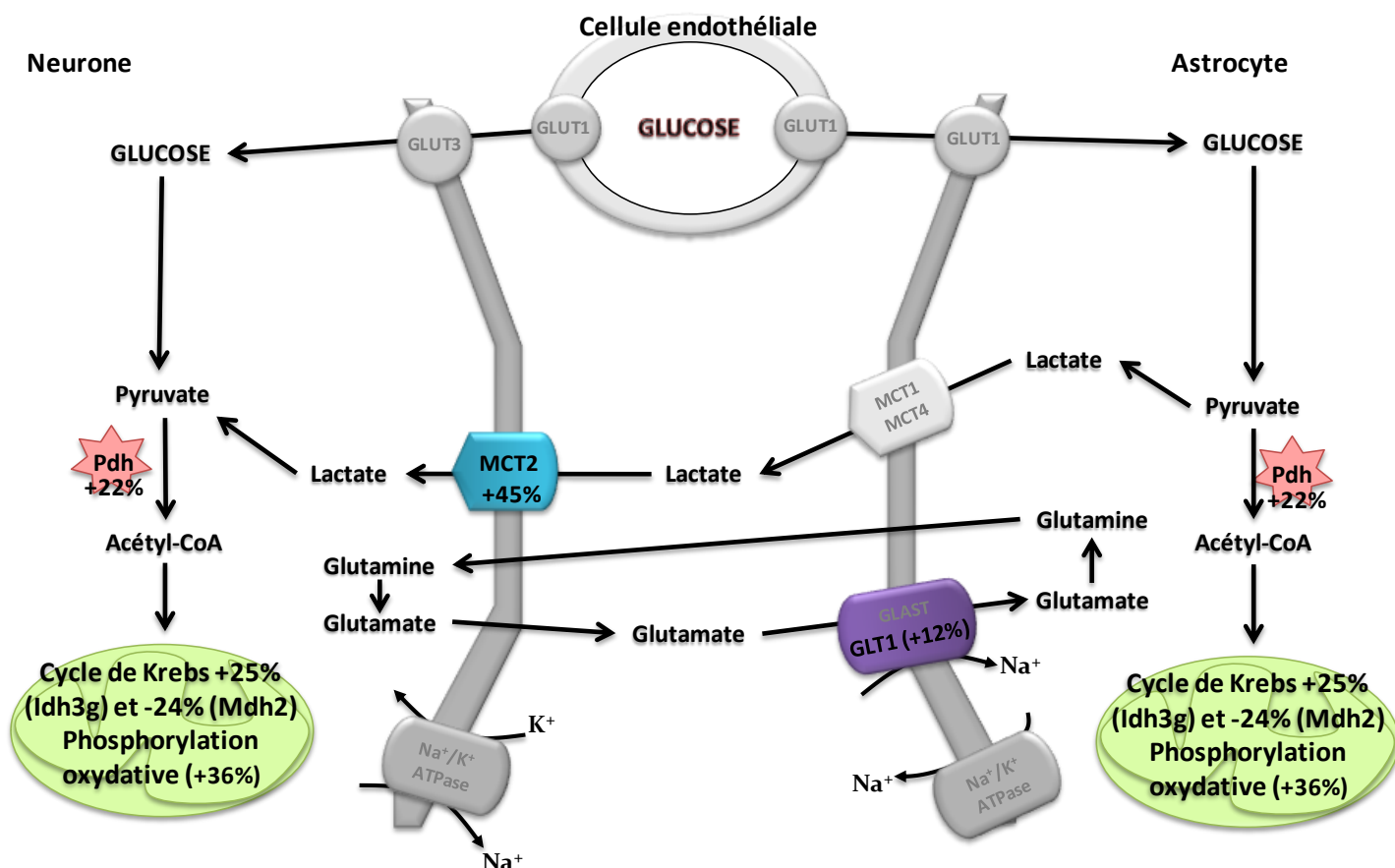
Figure 37 : Effet de la déficience alimentaire en AGPI n-3 sur les paramètres de cinétique d'utilisation du  $^{18}F$  FDG chez l'animal au repos.

	Equilibrés	Déficients
<b>Vitesse d'entrée (SUV/min), lors des 80 premières secondes</b>	3,19 ± 0,26	2,51 ± 0,20*
<b>SUV<sub>Max</sub></b>	2,59 ± 0,14	2,30 ± 0,13*

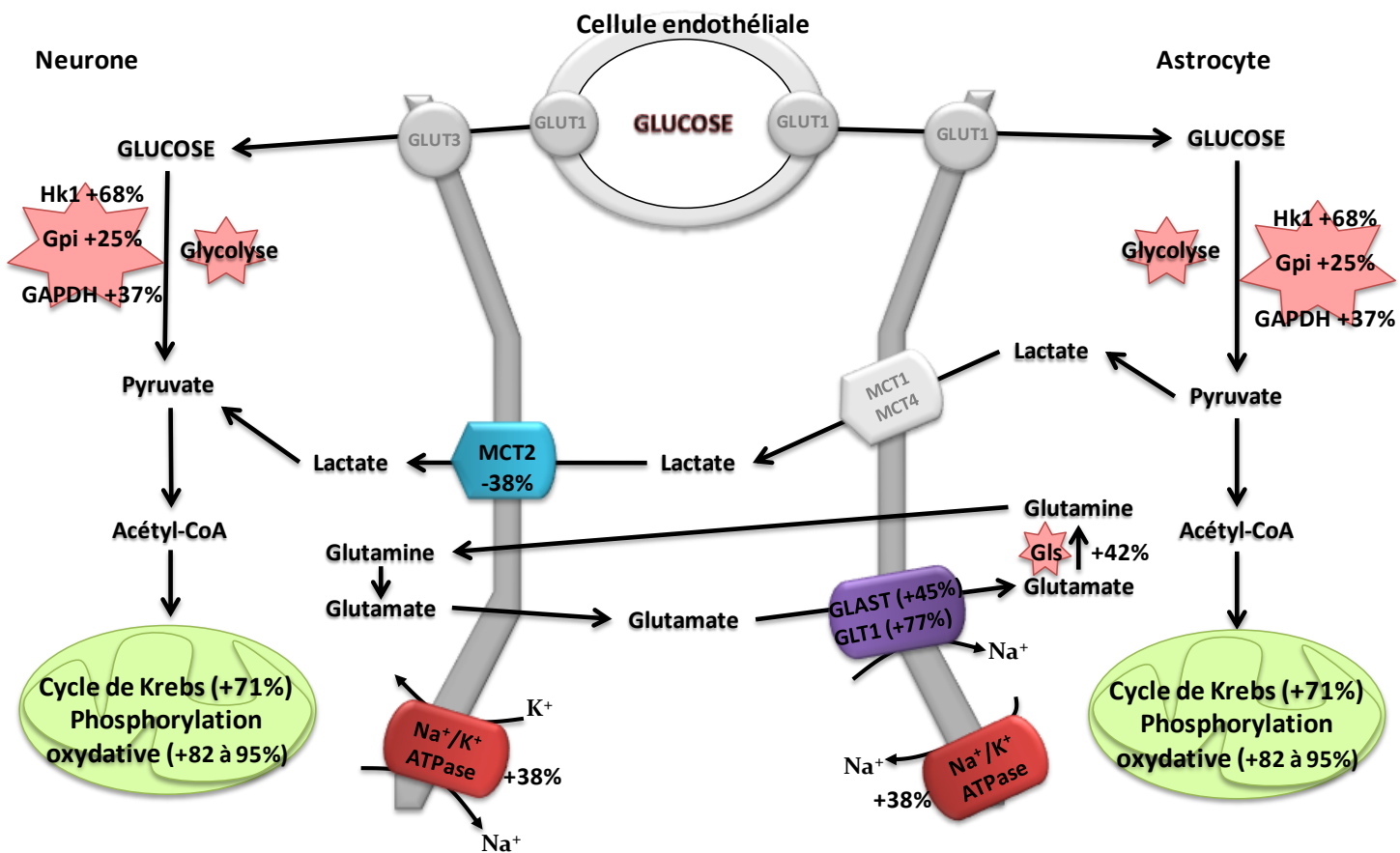
**Tableau 15 : Effet de la déficience alimentaire en AGPI n-3 sur les paramètres de cinétique d'utilisation du <sup>18</sup>FDG chez l'animal au repos.** \*Différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les valeurs moyennes ( $\pm$ SD, n=6).



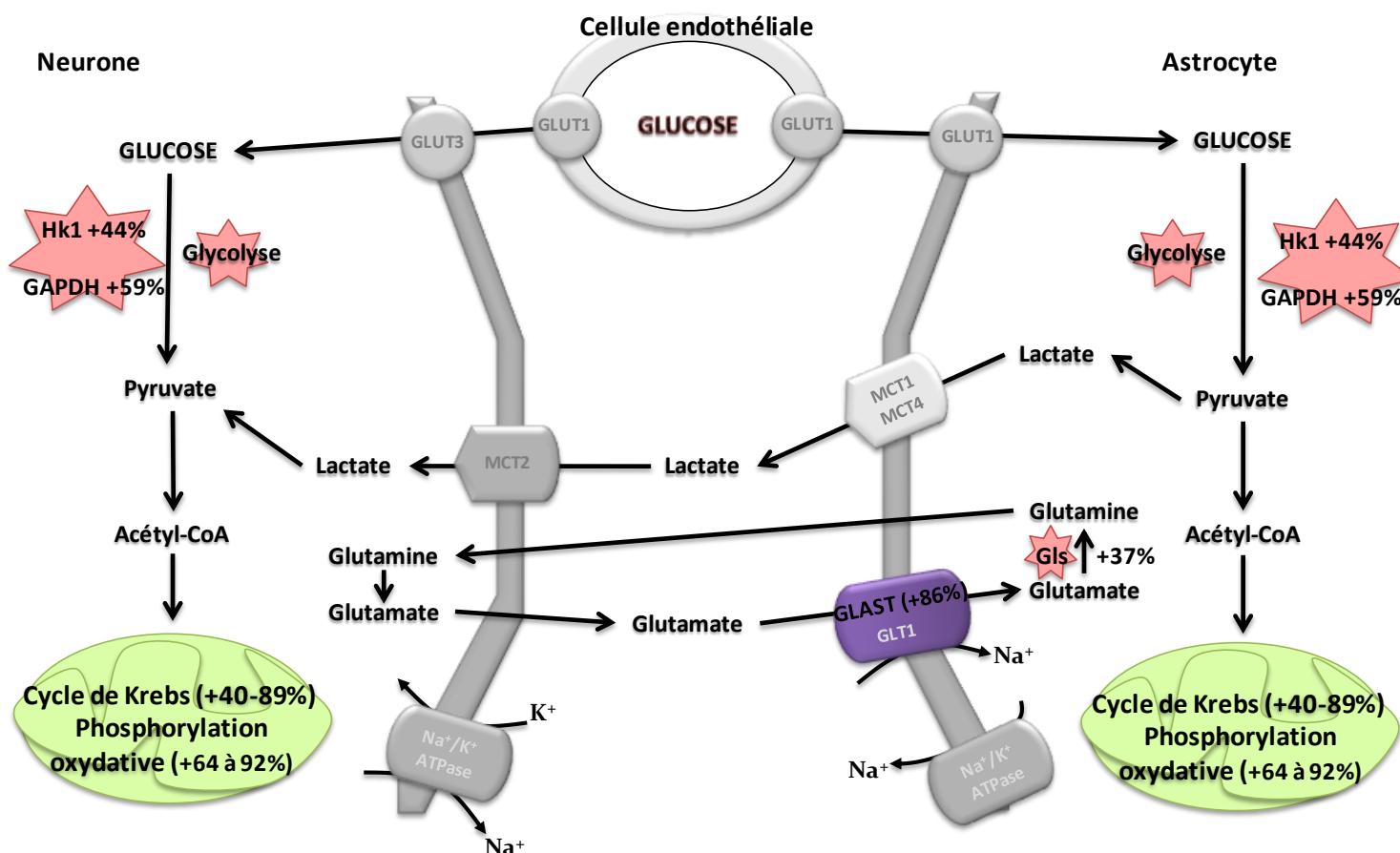
**Figure 38 : Variation d'expression des gènes du métabolisme énergétique chez les rats recevant un régime déficient en AGPI n-3 dans le cortex fronto-pariétal.** Les valeurs sont exprimées en % par rapport aux rats recevant un régime équilibré en AGPI n-6/n-3. **GLUT1** : transporteur de glucose (-33%,  $p=0,051$ ) ; **GLT1** : transporteur de glutamate (+18%,  $p=0,001$ ) ; **Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase** : pompe sodium/potassium (+26%,  $p=0,031$ ) ; **Phosphorylation oxydative** : Atp5b, complexe V (-22%,  $p=0,04$ ). ANOVA2, Tukey Test.



**Figure 39 : Variation d'expression des gènes du métabolisme énergétique chez les rats recevant un régime supplémenté en AGPI n-3 dans le cortex fronto-pariétal.** Les valeurs sont exprimées en % par rapport aux rats recevant un régime équilibré en AGPI n-6/n-3. **MCT2** : transporteur de lactate, isoforme neuronale (+45%,  $p=0,031$ ); **GLT1** : transporteur de glutamate (+12%,  $p=0,025$ ); **Pdh** : Pyruvate DésHydrogénase (+22%,  $p=0,057$ ); **Phosphorylation oxydative** : Sdha, complexe II (+36%,  $p=0,002$ ); **Cycle de Krebs** : Idh3g, Isocitrate DésHydrogénase (+25%,  $p=0,022$ ) et Mdh2, Malate DésHydrogénase (-24%,  $p=0,01$ ). ANOVA2, Tukey Test.



**Figure 40 : Variation d'expression des gènes du métabolisme énergétique chez les rats recevant un régime déficient en AGPI n-3 dans la couche CA1 de l'hippocampe.** Les valeurs sont exprimées en % par rapport aux rats recevant un régime équilibré en AGPI n-6/n-3. **MCT2** : transporteur de lactate, isoforme neuronale (-38%,  $p=0,003$ ); **GLT1** : transporteur de glutamate (+77%,  $p<0,001$ ); **GLAST** : transporteur de glutamate (+45%,  $p=0,013$ ); **Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase** : pompe sodium/potassium (+38%,  $p=0,04$ ); **Glycolyse** : Hk1, Hexokinase1 (+68%,  $p<0,001$ ), Gpi, PhosphoGlucosomérase (+25%,  $p=0,036$ ), GAPDH, PhosphoGlycérAldéhyde DésHydrogénase (+37%,  $p=0,019$ ); **Gls** : Glutamine synthase (+42%,  $p=0,007$ ); **Phosphorylation oxydative** : Cox6c, complexe IV (+95%,  $p<0,001$ ), Atp5j, complexe V (+82%,  $p<0,001$ ); **Cycle de Krebs** : Mdh2, Malate DésHydrogénase (+71%,  $p<0,001$ ). ANOVA2, Tukey Test.



**Figure 41 : Variation d'expression des gènes du métabolisme énergétique chez les rats recevant un régime supplémenté en AGPI n-3 dans la couche CA1 de l'hippocampe.** Les valeurs sont exprimées en % par rapport aux rats recevant un régime équilibré en AGPI n-6/n-3. **GLAST** : transporteur de glutamate (+86%,  $p < 0,001$ ); **Glycolyse** : Hk1, Hexokinase1 (+44%,  $p = 0,001$ ), GAPDH, PhosphoGlycérAldéhyde DésHydrogénase (+59%,  $p < 0,001$ ); **Gls** : Glutamine synthase (+37%,  $p = 0,018$ ); **Phosphorylation oxydative** : Uqcrc2, complexe III (+81%,  $p < 0,001$ ), Cox6c, complexe IV (+92%,  $p < 0,001$ ), Atp5j, complexe V (+85%,  $p < 0,001$ ) et Atp5o (+64%,  $p < 0,001$ ); **Cycle de Krebs** : Mdh1, Malate DésHydrogénase (+40%,  $p = 0,014$ ), Mdh2 (+89%,  $p < 0,001$ ). ANOVA2, Tukey Test.

# Approche *in vitro*

## I. Evolution des marqueurs du métabolisme énergétique au cours de la maturation de la culture d'astrocytes.

Les marqueurs du métabolisme énergétique ont été étudiés à 3 stades caractérisant la culture d'astrocytes : J6, stade de subconfluence ; J15, stade de confluence et J21, stade de différenciation.

### I.1.Métabolisme du glucose

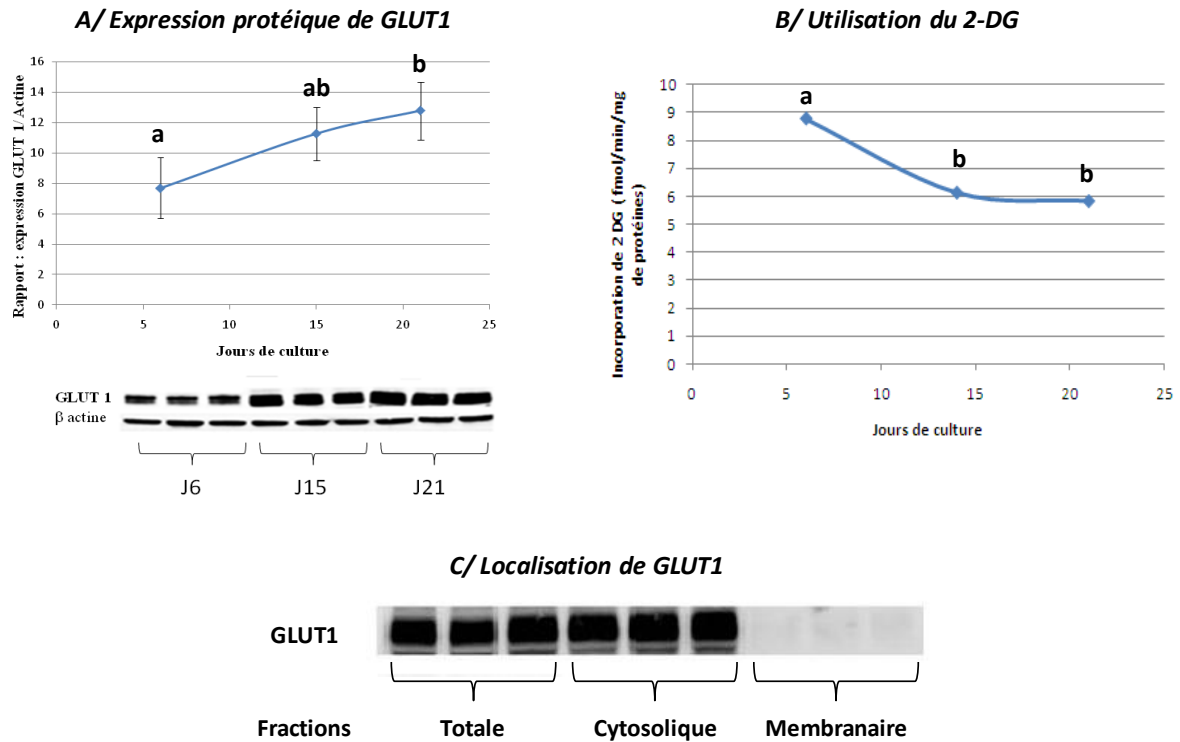
GLUT1 : expression et localisation. Les résultats obtenus montrent que le niveau d'expression de GLUT1 mesuré par Western Blot est doublé entre J6 et J15 car le rapport de l'expression de GLUT1/Actine passe de 7,7 à 11,3. Cette expression atteint un plateau au stade de différenciation (Figure 42). A ce stade de différenciation, la localisation du transporteur GLUT1 a été déterminée par biotinylation et Western blot. Les données montrent que GLUT1 est principalement exprimé au niveau cytoplasmique, aucun marquage GLUT1 n'est visible par Western Blot au niveau de la fraction membranaire (Figure 42).

Utilisation du glucose. Au contraire de l'expression protéique de GLUT dont le niveau d'expression augmente entre J6 et J15, le taux d'utilisation du glucose, mesurée par la méthode du 2-DG, diminue au cours de cette période (8,8 vs 6,1 fmol/min/mg de protéine) pour atteindre un plateau entre J15 et J21 (Figure 42).

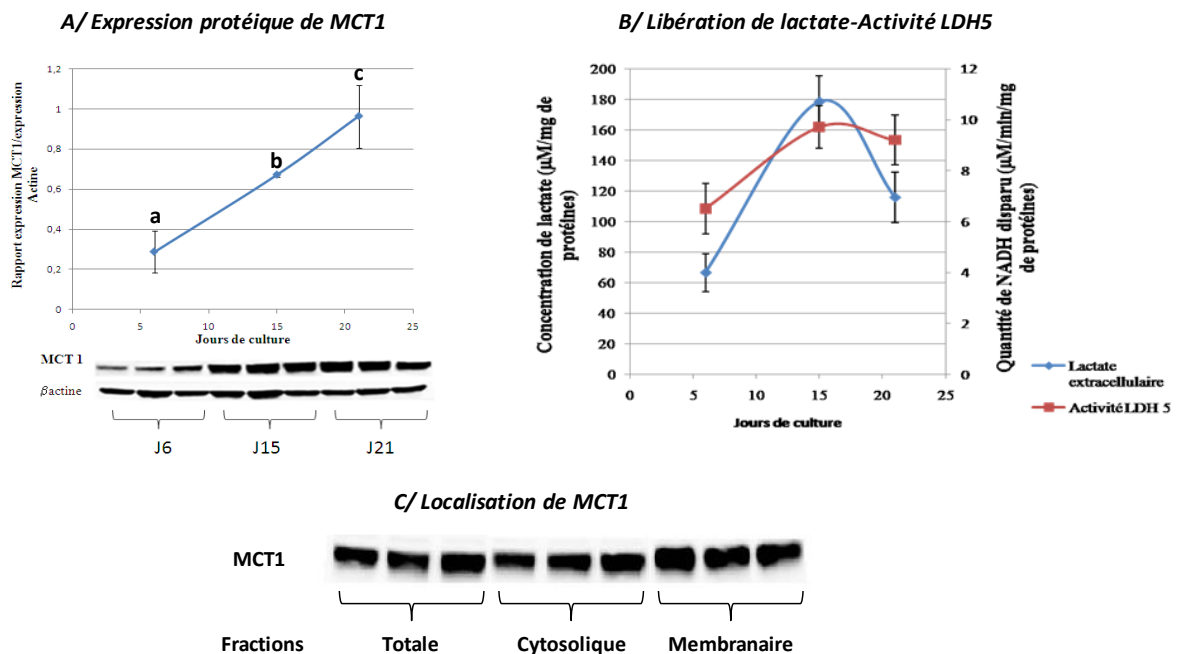
### I.2.Métabolisme du lactate

MCT1 : expression et localisation. L'expression du transporteur de lactate, MCT1, augmente de façon constante jusqu'à J21. Entre J6 et J21, l'expression de MCT1 est triplée (Figure 43). Le transporteur MCT1 se localise comme pour GLUT1 au niveau du cytoplasme et en plus au niveau de la membrane plasmique (Figure 43).

Libération de lactate et activité de la lactate déshydrogénase (LDH5). Entre le stade subconfluence et le stade de confluence, la concentration de lactate dans le milieu de culture est augmenté de façon considérable (66µM vs 178µM). Cette concentration diminue



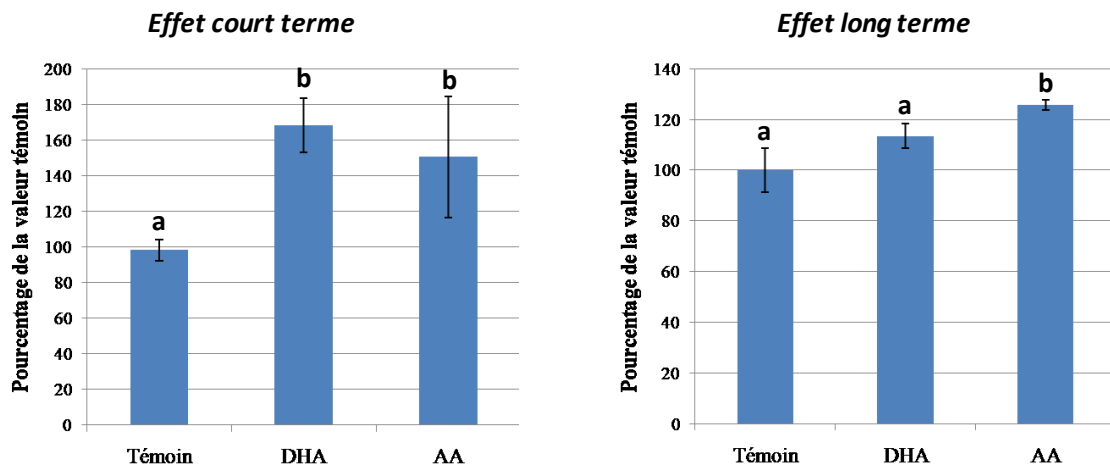
**Figure 42 : Evolution du métabolisme du glucose au cours de la culture d'astrocytes de J6 à J21.** A/ Evolution de l'expression protéique du transporteur GLUT1 au cours de la culture. B/ Utilisation du 2-DG, analogue non métabolisable du glucose. C/ Localisation par biotinylation et western blot du transporteur GLUT1.



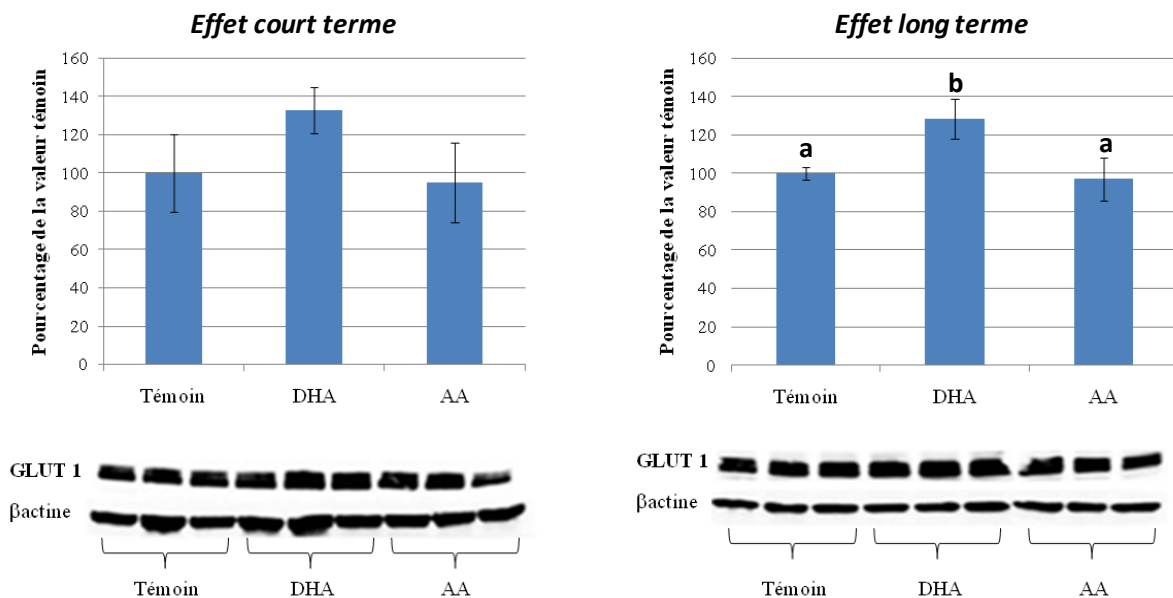
**Figure 43 : Evolution du métabolisme du lactate au cours de la culture d'astrocytes de J6 à J21.** A/ Evolution de l'expression protéique du transporteur MCT1 au cours de la culture. B/ Mesure de la libération de lactate dans le milieu et de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH5). C/ Localisation par biotinylation et western blot du transporteur MCT1.



## A/Utilisation du 2-DG



## B/Expression GLUT1



**Figure 44 : Effets des AGPI (à court et long terme) sur le métabolisme du glucose d'astrocytes à 21 jours de culture.** Mesure de l'utilisation du glucose par l'incorporation du 2-DG (A) et expression relative du transporteur GLUT1 (B), après une supplémentation à court terme au 21<sup>ème</sup> jour de culture (30 minutes avec 30μM de DHA ou AA) ou une supplémentation à long terme (30μM AGPI + VitE pendant 6 jours). Les valeurs représentent des moyennes des pourcentages de la valeur témoin ( $\pm$  SD).

<sup>a,b</sup> : les moyennes n'ayant pas de lettre identique sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

ensuite entre le stade de confluence et celui de différenciation. L'activité de la LDH5 augmente entre les 2 premiers stades pour se stabiliser à J21, la concentration de lactate dans le milieu de culture suivant une cinétique tout à fait similaire (Figure 43).

## **II. Effet d'une supplémentation en AGPI longue chaîne (DHA et AA) sur les paramètres du métabolisme énergétique.**

### **II.1. Métabolisme du glucose (Figure 44)**

**Supplémentation à court terme.** Après une incubation de 30 minutes des cellules au stade 21 jours avec 30 $\mu$ M de DHA ou d'AA des cellules de 21 jours, une augmentation de l'utilisation du 2-DG est observée. Le niveau de stimulation suite à une supplémentation en DHA est plus élevé que lors d'une supplémentation en AA (70% et 50%, respectivement) mais les différences mises en évidence ne sont pas statistiquement significatives. En ce qui concerne l'expression du transporteur GLUT1, il n'y a pas d'effet significatif des AGPI avec cependant une tendance à augmenter l'expression de GLUT1 pour le DHA (30% avec  $p=0,074$ ).

**Supplémentation à long terme.** Pendant 6 jours, les cellules sont incubées avec 30 $\mu$ M d'AGPI. Seul l'AA stimule significativement (+25%) l'utilisation du glucose des astrocytes au stade 21 jours de culture. En revanche au niveau de l'expression protéique, le phénomène inverse est observé. En effet, l'expression de GLUT1 est augmentée de 28% ( $p=0,011$ ) avec une supplémentation en DHA alors qu'elle n'est pas modifiée avec l'AA.

### **II.2. Métabolisme du lactate (Figure 45)**

**Supplémentation à court terme.** L'expression protéique du transporteur MCT1 est augmentée de 71% lorsque le milieu de culture est additionné de DHA. En revanche la supplémentation du milieu de culture avec de l'AA il n'a aucune incidence sur le niveau d'expression de MCT1. La production de lactate dans le milieu n'est pas modifiée par l'ajout d'AGPI, elle reste à une valeur constante soit environ 3,20 $\mu$ mol/L/mg de protéines (valeur de la condition témoin). L'activité de la LDH5 est modulée par l'ajout d'AA qui présente un effet potentialisateur sur son activité alors que le DHA n'a pas d'effet significatif.

**Supplémentation à long terme.** Suite à une supplémentation à long terme, les 2 AGPI ne présentent pas d'effet sur l'expression protéique du transporteur MCT1 et sur l'activité de la lactate déshydrogénase. La libération de lactate dans le milieu est le seul facteur du métabolisme du lactate modifié par une supplémentation à long terme en DHA. En effet, le DHA réduit la concentration en lactate de 20% ( $p < 0,05$ ) alors que l'AA n'a pas d'effet significatif.

### **III. Effets d'une supplémentation en AGPI en situation d'activation glutamatergique sur les paramètres du métabolisme énergétique**

#### **III.1. Effet du glutamate**

L'ajout de glutamate à une concentration de 200 $\mu$ M stimule le métabolisme du glucose. En effet, l'expression protéique de GLUT1 est augmentée de 18% ( $p = 0,052$ ) ainsi que l'utilisation du 2-DG ( $p = 0,025$ ). Au niveau du métabolisme du lactate, seule la libération du lactate est augmentée (36% avec  $p > 0,01$ ), l'activité de la LDH5 et l'expression de MCT1 n'étant pas modifiées par l'ajout de glutamate dans le milieu de culture (Figure 46).

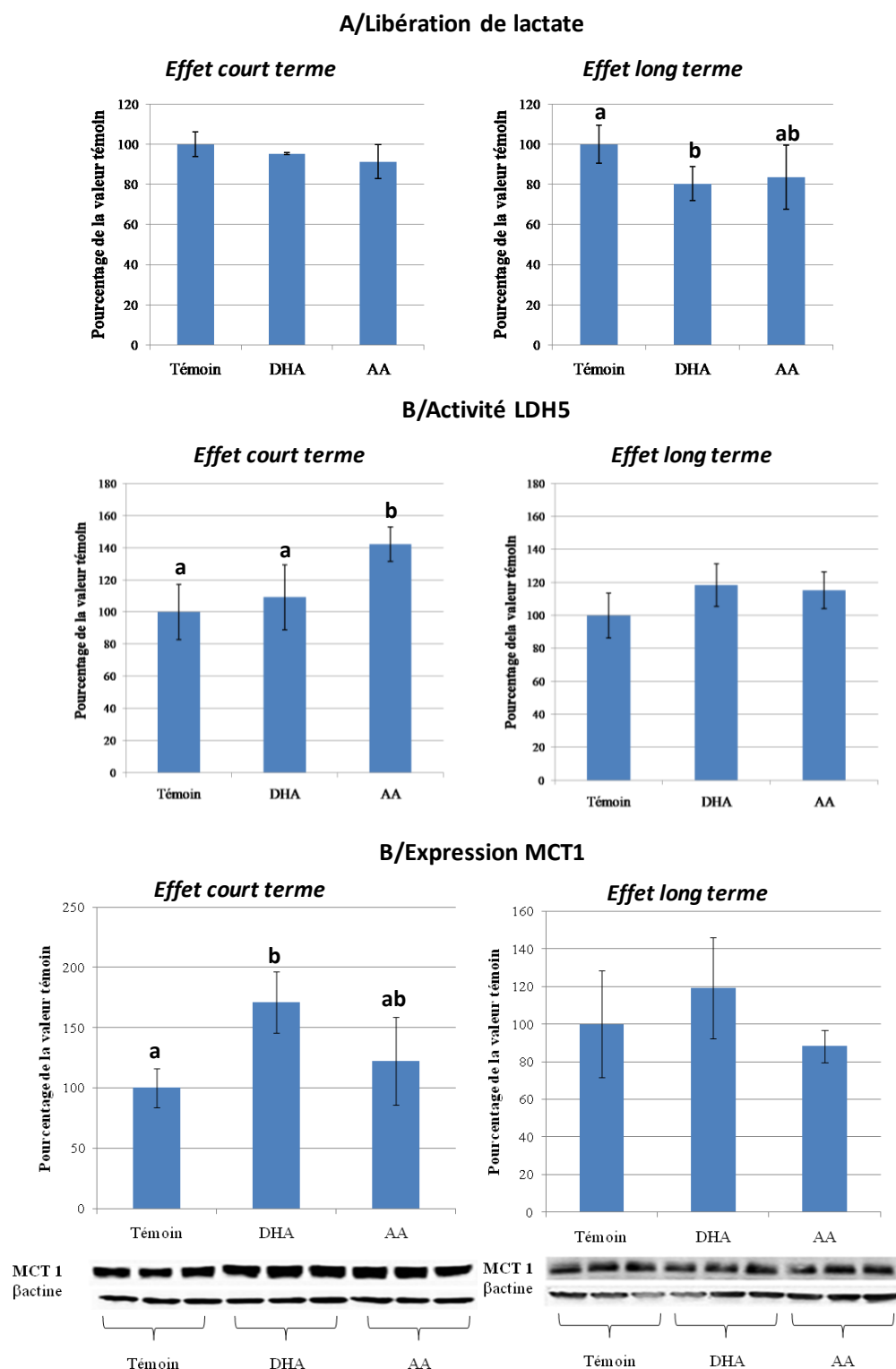
#### **III.2. Métabolisme du glucose (Figure 47)**

**Supplémentation à court terme.** L'expression relative du transporteur GLUT1 a été évaluée après l'ajout de 200 $\mu$ M de glutamate dans le milieu de culture pendant 30 minutes. La supplémentation à court terme en AA et DHA est effectuée comme précédemment exposé soit à une concentration de 30 $\mu$ M pendant 30min. Il n'y a pas d'effet sur l'expression de GLUT1 lors d'une supplémentation en DHA ou en AA. Par contre la supplémentation en DHA conduit à une augmentation de l'utilisation du 2-DG.

**Supplémentation à long terme.** Pendant 6 jours, 30 $\mu$ M d'AGPI (DHA ou AA) sont ajoutés dans le milieu de culture des cellules ainsi que 200 $\mu$ M de glutamate 30 minutes avant la récolte des cellules pour les analyses. Dans ce cas, l'AA augmente l'expression relative de GLUT1 de plus de 80% et l'utilisation du 2-DG est augmentée par le DHA et l'AA (22%).

#### **III.3. Métabolisme du lactate (Figure 47)**

**Supplémentation à court terme.** L'ajout de DHA ou d'AA dans le milieu de culture n'entraîne aucune modification de l'activité de la LDH5. En revanche, on peut noter que la production

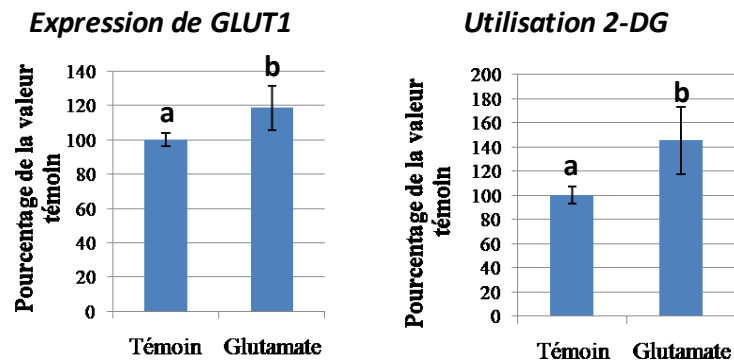


**Figure 45 : Effets des AGPI (à court et long terme) sur le métabolisme du lactate d'astrocytes à 21 jours de culture.** A/Mesure de libération de lactate dans le milieu extracellulaire sur 24h lors d'une supplémentation à long terme et sur 30min lors d'une supplémentation à court terme. Mesure de l'activité de la LDH5 (B) et expression relative du transporteur MCT1 (C), après une supplémentation à court terme au

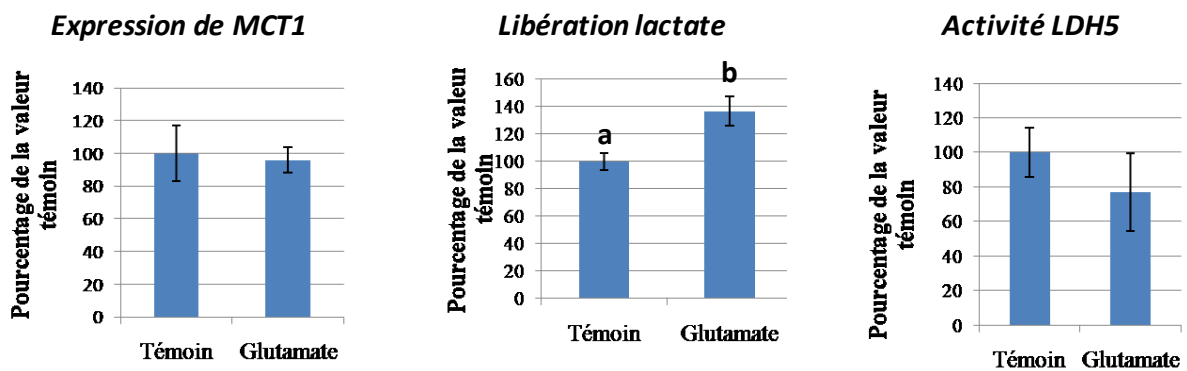
21<sup>ème</sup> jour de culture (30min ; 30µM de DHA ou AA) ou une supplémentation à long terme (6jrs ; 30µM AGPI + VitE). Les valeurs représentent des moyennes des pourcentages de la valeur témoin ( $\pm$  SD).

<sup>a,b</sup> : les moyennes n'ayant pas de lettre identique sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

### A/Métabolisme du glucose



### B/Métabolisme du lactate



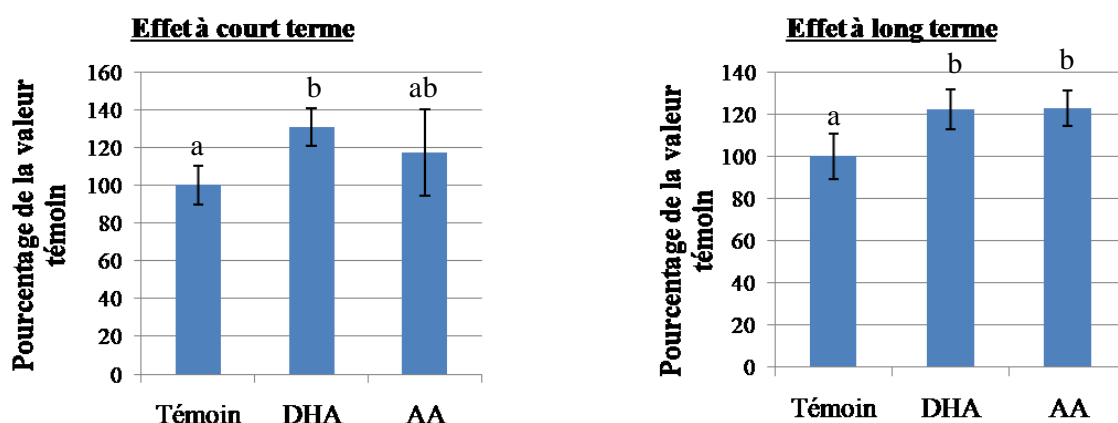
**Figure 46 : Effets du glutamate sur les paramètres du métabolisme énergétique astrocytaire.** Le glutamate est ajouté à une concentration finale de 200µM 30 minutes avant la récolte des cellules. A/Effet sur le métabolisme du glucose : expression relative du transporteur GLUT1 et utilisation du 2-DG (analogue du glucose). B/Effet sur le métabolisme du lactate : expression relative du transporteur MCT1, mesure de la libération de lactate dans le milieu extracellulaire et de l'activité de la LDH5 (spectrophotométrie à 340nm). Les valeurs représentent des moyennes des pourcentages de la valeur témoin ( $\pm$  SD).

<sup>a,b</sup> : les moyennes n'ayant pas de lettre identique sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

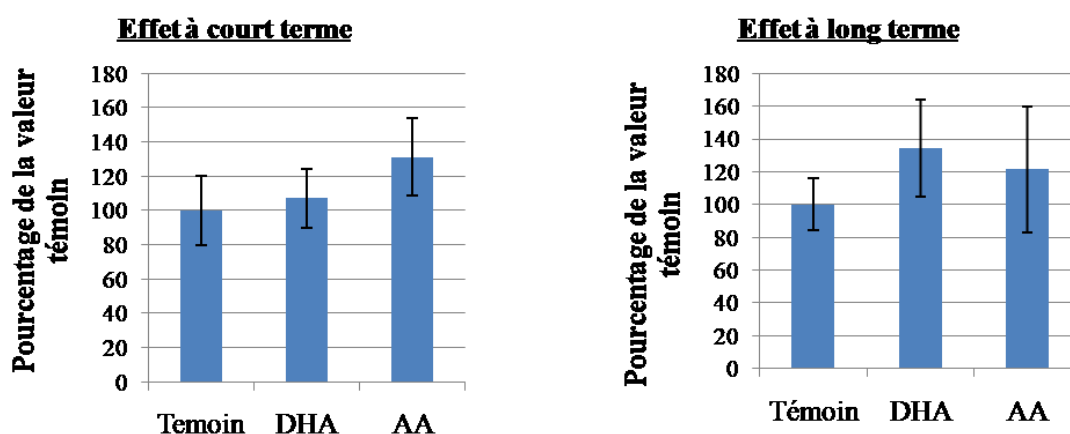
de lactate est diminuée par l'AA et non par le DHA. Par contre l'expression du transporteur MCT1 est augmentée spécifiquement par le DHA (48%).

***Supplémentation à long terme.*** Lors d'une stimulation au glutamate, Il n'y a pas d'effet d'une supplémentation à long terme en DHA ou en AA sur l'ensemble des paramètres étudiés du métabolisme du lactate.

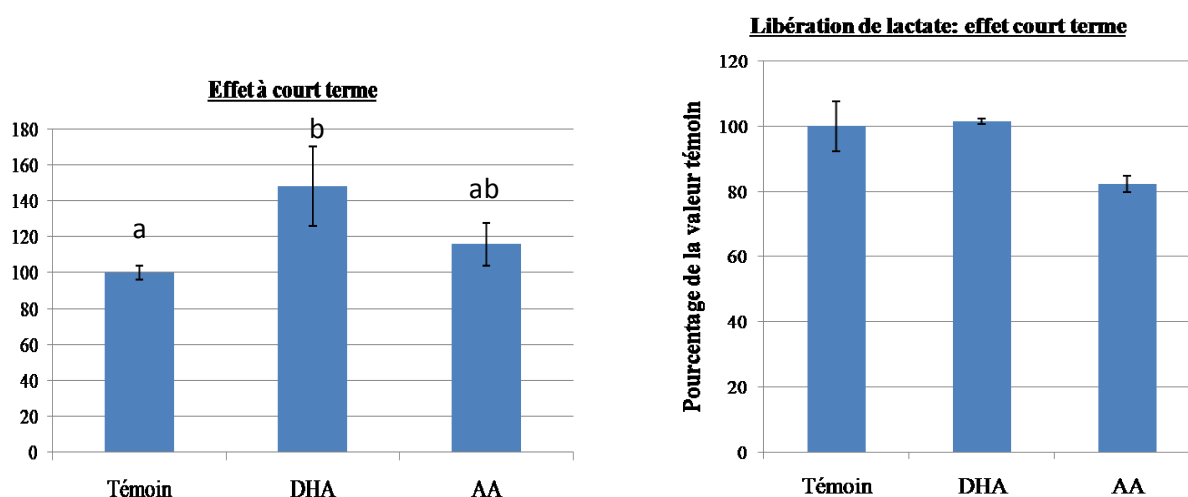
### A- Utilisation du glucose



### B- Activité de la LDH 5



### C- Expression de MCT1 et Libération de lactate



**Figure 47 : Effets des AGPI et de l'ajout de glutamate(200µM finale) sur l'utilisation du glucose, l'activité de la LDH5, la libération de lactate et l'expression de MCT1.** L'utilisation du glucose est réalisée mesurée par l'incorporation du 2 DG. L'activité de la LDH5 et de la libération sont dosées par dosage spectrophotométrique à la longueur d'onde de 340nm. Les supplémentations en AGPI sont effectuées comme précédemment. Les valeurs présentées sont les moyennes des pourcentages de la valeur témoin  $\pm$  écart-types.

<sup>a,b,c</sup> : les moyennes qui ne comportent pas de lettre identique sont significativement différentes ( $P < 0.05$ )

# DISCUSSION



Le métabolisme énergétique cérébral, à travers l'utilisation et l'oxydation du glucose, est une composante essentielle de l'activité neuronale assurant le contrôle des potentiels de membranes, lesquels sont particulièrement coûteux en énergie. Au niveau de la synapse glutamatergique, ce métabolisme fournit également l'énergie nécessaire au processus de captage du glutamate au niveau synaptique. Le fonctionnement métabolique de cette synapse implique la participation coordonnée de 3 types cellulaires qui réalisent un couplage neuro-métabolique. La cellule endothéliale de la barrière hématoencéphalique contrôle le passage du glucose depuis la circulation vers le parenchyme cérébral, tandis que l'astrocyte régule la teneur en glutamate du microenvironnement via des transporteurs spécifiques et assure la fourniture de lactate au neurone en situation d'activation comme substrat alternatif au glucose. En effet dans cette situation, le neurone est alors dans l'impossibilité métabolique d'augmenter l'utilisation du glucose via la glycolyse.

Les données de la littérature, ainsi que celles obtenues par notre équipe de recherche mettent en avant un lien entre l'apport alimentaire en AGPI n-3, le statut cérébral en ces acides gras et le métabolisme énergétique cérébral qui apparaît modifié à plusieurs niveaux (Ximenes et *al.*, 2002 ; Pifferi et *al.*, 2005 ; Farkas et *al.*, 2002, 2003 ; Kitajka et *al.*, 2004 ; Bourre et *al.*, 1989 ; Sublette et *al.*, 2009). Notamment sur modèle animal (rat), il a été mis en évidence qu'un déficit alimentaire chronique en AGPI n-3 provoque à l'âge adulte une diminution de l'utilisation cérébrale de glucose au niveau cortical et hippocampique ainsi que de l'activité d'un complexe enzymatique clé de la phosphorylation oxydative mitochondriale (cytochrome oxydase). Ces modifications ont été pour l'instant reliées à une réduction globale de l'activité de transport du glucose du fait d'une diminution de l'expression protéique du transporteur de glucose GLUT1 (endothélial et astrocytaire). Ces effets font probablement intervenir une régulation de l'expression génique comme il a été décrit au niveau cérébral et notamment pour certains complexes de la chaîne respiratoire.

Cependant, l'origine des modifications observées reste une question que nous avons examinée dans mon travail de thèse par l'étude de l'ensemble des étapes clés du métabolisme énergétique cérébral susceptibles d'être perturbées par le statut cérébral en AGPI n-3 et tout particulièrement par la situation de déficit prononcé en DHA. Notre réflexion s'est construite autour du schéma neuro-métabolique initialement proposé par Magistretti et *al.*, (1994) (Figure 14 page 43). Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à

mettre en évidence ces étapes clés du métabolisme énergétique cérébral en évaluant le niveau de modulation par l'apport alimentaire en n-3 de l'expression des gènes cibles. Dans ce travail, le statut cérébral en AGPI n-3 des animaux a été modulé par 2 manipulations alimentaires, la déficience chronique et la supplémentation en DHA. Des études précédentes (Hichami et *al.*, 2007) ont montré que, chez des rats déficients en AGPI n-3, l'activation des neurones olfactifs en réponse à un test de discrimination olfactive était diminuée en association avec une réduction de l'expression de GLUT1. Avec l'idée que l'activation neuronale devrait permettre de mieux identifier les effets possibles des variations de composition membranaire en AGPI, nous avons réalisé un test d'activation pour lequel nous avons au préalable vérifié que le cortex frontal et la couche CA1 de l'hippocampe répondaient fortement au placement des animaux dans un environnement enrichi (induction de l'expression de c-fos). Nous avons donc focalisé nos observations sur ces 2 zones pour lesquelles nous avons analysé la composition des phospholipides membranaires et mesuré l'expression des 44 gènes sélectionnés. Compte tenu de l'hétérogénéité des résultats obtenus entre les 2 structures, nous avons pris le parti de traiter les résultats indépendamment en gardant l'objectif de proposer une piste d'action des AGPI en tant qu'acteurs ou régulateurs du métabolisme énergétique cérébral.

En préambule de la discussion détaillée des résultats, nous aborderons la question générale de la grande disparité structurale et fonctionnelle des régions cérébrales par une description rapide de la composition et de l'organisation cellulaire de chacune d'elles.

- Le cortex est une structure fine dont l'épaisseur varie de 2 à 4mm constituée majoritairement de substance grise. Au niveau histologique on distingue 6 couches horizontales numérotées à partir de la surface. La couche I (couche moléculaire), située au contact de la pie-mère, est constituée principalement de fibres nerveuses et de cellules gliales, elle est dépourvue de corps cellulaires. La couche II (couche granulaire externe) est constituée de petits neurones dits « neurones granulaires ». La couche III (couche des cellules pyramidales) contient la majorité des corps cellulaires des neurones pyramidaux. La couche IV (couche granulaire interne) est constituée essentiellement de neurones étoilés ayant une arborisation dendritique importante. La couche V (couche ganglionnaire) se compose essentiellement de neurones pyramidaux dont les dendrites se projettent dans la couche 2 et la couche 4. La couche VI (couches des cellules polymorphes).

L'organisation cellulaire (nombre de couches, épaisseur, arborisation dendritique) du cortex cérébral varie selon la localisation considérée.

- L'hippocampe est une petite structure sous corticale enroulée sur elle-même. L'hippocampe proprement dit est formé du Gyrus Dentelé (gyrus dentatus) et de la Corne d'Ammon elle-même subdivisée en CA1, CA2 et CA3 (corne d'Ammon 1, 2 et 3). Il est caractérisé par un circuit neuronal trisynaptique : les cellules granulaires contenues dans le gyrus dentelé envoient massivement leurs axones (fibres moussues) vers la zone CA3 : il y a formation de synapses avec les dendrites des cellules pyramidales de cette zone. Puis les axones des cellules pyramidales de la zone CA3 projettent leurs axones vers les dendrites des cellules pyramidales de la zone CA1 (collatérales de Schaeffer). Contrairement à l'organisation complexe du cortex, la zone CA1 est une couche dense homogène de petites cellules pyramidales.

Ces 2 structures se distinguent aussi par la présence et l'organisation des astrocytes.

Dans ce contexte, nous essayerons d'établir en quoi ces différences morpho-fonctionnelles peuvent être à l'origine des particularités que nous avons observées pour chacune des zones.

En parallèle de l'étude transcriptomique, le niveau global d'utilisation cérébrale du glucose a été quantifié chez les animaux chroniquement déficients en n-3 par la technique du fluoro-déoxy-glucose couplée à l'imagerie TEP permettant notamment une mesure dynamique du processus d'entrée du glucose liée à la disponibilité des transporteurs de glucose. Enfin, une approche *in vitro* sur des astrocytes en culture primaire a permis de tester l'hypothèse que les AGPI n-3 pouvaient exercer, comme il a été décrit pour les cellules endothéliales (Pifferi *et al.*, 2010), des effets directs sur le métabolisme du glucose mais également sur la production de lactate en situation basale et d'activation glutamatergique.

L'analyse lipidique a montré que les modifications induites par les régimes alimentaires appauvri ou enrichi en AGPI n-3 sont non seulement dépendantes du régime mais aussi de la zone cérébrale considérée. L'évaluation de l'incidence globale au niveau cérébral est apportée par l'imagerie FDG-TEP qui démontre que les animaux chroniquement déficients en n-3 souffrent d'un hypométabolisme cérébral du glucose caractérisé par une réduction simultanée de la vitesse d'entrée et du plateau d'utilisation maximale du glucose. Les

résultats de nos analyses transcriptomiques mettent en évidence que l'apport alimentaire en AGPI n-3 perturbe le métabolisme énergétique à plusieurs niveaux. En effet, si la déficience affecte plus spécifiquement l'expression du transporteur GLUT1 dans le cortex au repos et sous activation, la supplémentation en DHA en revanche affecte plutôt l'activité mitochondriale (phosphorylation oxydative et Cycle de Krebs) dans les 2 situations. Les données révèlent que la couche CA1 de l'hippocampe répond de façon très différente, l'expression de GLUT1 n'étant pas modifiée par la déficience tandis que le métabolisme du glutamate est fortement perturbé. Les données recueillies sur le modèle d'astrocytes en culture primaire mettent évidence un effet direct et spécifique des AGPI n-3 (DHA) sur le métabolisme énergétique de ces cellules, effet favorisant principalement l'utilisation du glucose.

La discussion portera donc sur ces différents points et abordera dans une première partie les conséquences de l'apport alimentaire en AGPI n-3 (déficience, supplémentation) sur le statut lipidique des deux zones cérébrales d'intérêt.

## 1) Statut lipidique cérébral

- Déficience en AGPI n-3

Nos résultats sur le statut cérébral en AGPI sont en parfait accord avec les données initialement publiées (Ximenes *et al.*, 2002 ; Pifferi *et al.*, 2005). Ils montrent ainsi que des rats adultes nés de mères déficientes en AGPI n-3 et ayant reçu après le sevrage le régime déficient (1<sup>ère</sup> génération de déficience), présentent une réduction de la teneur en DHA d'environ 60% au niveau du cortex, réduction qui est de même amplitude dans l'hippocampe. Cette diminution se retrouve pour toutes les classes de phospholipides quelle que soit la concentration initiale de DHA (élevée pour les GPE et la PS, faible pour la PC). En terme d'amplitude, cette diminution est importante, mais relativement peu marquée en regard de l'alimentation de ces animaux qui est presque totalement dépourvue d'AGPI n-3 (moins de 0,1% des acides gras totaux sous la forme d'acide  $\alpha$ -linoléique et absence de DHA), et dont le rapport 18:2 n-6/18:3 n-3 élevé (>200) se traduit par un déséquilibre métabolique favorisant le métabolisme des AGPI n-6. L'analyse de la teneur en acides gras du foie et du plasma, marqueurs du niveau de consommation et du métabolisme des AGPI, montre bien l'ampleur de ce déficit car la teneur en DHA y a chuté de plus de 85%.

L'ensemble de ces données démontre donc que le cerveau est un tissu bien protégé d'un déficit en AGPI n-3, mettant probablement en jeu plusieurs mécanismes favorisant spécifiquement leur métabolisme. Parmi ces mécanismes, on peut évoquer un ralentissement spécifique du métabolisme du DHA et notamment de son turn-over au niveau des membranes cérébrales. Après une injection intraventriculaire de DHA marqué au tritium, DeMar *et al.* (2004) ont ainsi montré que la demi-vie du radiotracer était réduite d'un facteur 2 dans les phospholipides totaux cérébraux des animaux ayant reçu un régime totalement dépourvu d'AGPI n-3. Le second mécanisme que l'on peut évoquer, mais pour lequel il n'y a pas de données expérimentales, concerne le transfert sélectif des acides gras vers le cerveau *via* la barrière hématoencéphalique (BHE). Cette dernière constituerait un élément de régulation, mettant en jeu un processus sélectif et spécifique de transfert des AGPI (n-3 par rapport aux n-6) pris en charge par des protéines de transport et de liaison. Ce processus a pu être décrit pour d'autres cellules polarisées comme les cellules intestinales (Niot *et al.*, 2009). Des données récentes mettent en effet en évidence que le niveau

d'incorporation du DHA dans les phospholipides membranaires cérébraux de l'animal adulte se maintient, malgré des statuts circulants en défaveur de cet AGPI lié à une alimentation déséquilibré (rapport AA/DHA 3 fois plus élevé que la normale) (Massiera *et al.*, 2010). Il est également possible que le cerveau puisse synthétiser *in situ* des quantités appréciables de DHA à partir des faibles concentrations circulantes d'acide  $\alpha$ -linolénique. On sait en effet que l'ensemble des gènes de la voie de bioconversion des AGPI est exprimé dans le cortex cérébral, les  $\Delta$ -6 et  $\Delta$ -5 désaturase étant cependant 2 à 4 fois moins exprimées dans ces tissus qu'elles ne le sont dans le foie (Extier *et al.*, 2010 ; Alessandri *et al.*, 2010).

Par ailleurs, les cellules nerveuses (astrocytes, neurones) en culture possèdent la capacité métabolique de bioconvertir les AGPI précurseurs et voient l'expression des gènes clés (désaturases) régulée par le niveau d'apport en acide  $\alpha$ -linolénique (Bernoud *et al.*, 1998 ; Kaduce *et al.*, 2008). Il en va de même dans des cellules de neuroblastome humain, dont la capacité de synthèse du DHA à partir de l'ALA est cependant moindre que celui de ses précurseurs métaboliques, l'EPA et le DPA (Langelier *et al.*, 2005). On peut émettre l'hypothèse que l'activité de cette voie métabolique pourrait être activée dans le cerveau en situation de déficience alimentaire en AGPI n-3 pour préserver un flux minimum de biosynthèse de DHA. Des données récentes recueillies chez le rat déficient en AGPI n-3 mettent en évidence une augmentation significative du taux de biosynthèse hépatique du DHA à partir de l'ALA, de l'activité et de l'expression génique et protéique des  $\Delta$ -6 et  $\Delta$ -5 désaturases et des élongases 2 et 5, et de l'index de l'étape de  $\Delta$ -4 désaturation nette du DPA en DHA (Alessandri *et al.*, 2011). Cette stimulation métabolique a été observée dans le foie, mais il n'existe pas de données équivalentes prouvant qu'elle se produit également dans le cerveau. Une participation active du cerveau à des stades de développement intermédiaires pour lesquels le niveau d'incorporation du DHA est particulièrement intense est également écarté car la synthèse hépatique post-sevrage chez le rat témoin excède très largement la consommation cérébrale de DHA (Gao *et al.*, 2011).

Un grand nombre d'études, ayant caractérisé au niveau cérébral les propriétés fonctionnelles des AGPI n-3, ont été conduites sur des modèles de carence en n-3 beaucoup plus prononcée que celui utilisé dans ce travail. Ces modèles sont généralement menés sur plusieurs générations de femelles (2 à 5) ou plusieurs gestations successives et permettent de réduire de plus de 80% la teneur cérébrale en DHA (Guesnet *et al.*, 1988 ; Alessandri *et*

*al.*, 2003 ; Chalon, 2006 ; Federova et Salem, 2006). Pour notre part, nous avons choisi de travailler sur une première génération de rat déficient en AGPI n-3 pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les résultats déjà acquis sur le métabolisme énergétique ont exclusivement utilisé ce modèle animal de déficience (Ximenes *et al.*, 2002 ; Pifferi *et al.*, 2005, 2007). Ce modèle nous paraît plus physiologique que les autres car la diminution de DHA obtenue est du même ordre de grandeur que celle observée dans des groupes de populations particulièrement exposés à des défauts d'apport en AGPI n-3. C'est le cas notamment des enfants nouveau-nés (prématurés et nés à terme) qui avaient reçu pendant 2 à 6 mois suivant leur naissance des laits artificiels à base d'huile de maïs donc pauvres en AGPI n-3 et déséquilibré dans le rapport 18:2 n-6/18:3 n-3. Au niveau de leur cortex cérébral, des diminutions marquées des concentrations en DHA, pouvant atteindre des valeurs supérieures à 50%, ont été observées (Farquharson *et al.*, 1992, 1995 ; revue de Guesnet et Alessandri, 1995). On peut suggérer que de telles diminutions existent également, au cours de la première année de vie, chez les enfants dont les mères ont consommé un régime particulièrement pauvre en AGPI n-3 (moins de 500mg/jour d'ALA et seulement 10mg/jour de DHA) (Innis et Friesen, 2008). Il est utile de rappeler que dans ces cas extrêmes de déficience alimentaire en AGPI n-3, les conséquences physiologiques restent discrètes et n'engendrent pas de pathologies déclarées, notamment au niveau du développement de l'acuité visuelle (Uauy *et al.*, 1990 ; Innis et Friesen, 2008). Citons un autre modèle animal "physiologique" dans lequel la déficience en AGPI n-3 est appliquée seulement après l'étape de sevrage et sur une durée de 15 semaines (Irigashi *et al.*, 2007a et b). Ce modèle de perturbation post-natale provoque une diminution de la teneur cérébrale en DHA comprise entre 40 et 50% ainsi que des effets neurophysiologiques significatifs (voies du BDNF et des phospholipases) (Rao *et al.*, 2007a et b). Enfin, dans le modèle de carences multi-générationnelles on peut supposer que les altérations neurophysiologiques qui en découlent sont irréversibles et s'inscrivent alors dans un processus d'empreinte nutritionnelle. En effet, les données acquises sur ces modèles montrent que les animaux déficients en AGPI n-3 peuvent récupérer une teneur correcte en DHA après la réintroduction au sevrage de cette famille d'acides gras dans l'alimentation, tandis que les perturbations physiologiques persistent à l'âge adulte comme cela a été rapporté dans la neurotransmission monoaminergique (Kodas *et al.*, 2002). Ce phénomène d'irréversibilité a été également mis en évidence dans le tissu adipeux de souris soumises à un déséquilibre d'apport en AGPI n-3

pendant 2 à 4 générations (non réversibilité du phénotype obèse et de l'expression des gènes pro-inflammatoires dans le stroma vasculaire) (Massiera *et al.*, 2010).

La diminution de la teneur cérébrale en DHA chez les animaux déficients en n-3 est compensée entièrement par la synthèse et l'incorporation d'un AGPI à longue chaîne de la série n-6 à partir de l'AA, le DPA (n-6). Ce phénomène de compensation permet un maintien de la teneur membranaire en AGPI totaux à 22C comme il a été initialement décrit (Galli *et al.*, 1974 ; Guesnet *et al.*, 1988). Cependant, ce phénomène de compensation ne permet pas de maintenir une activité physiologique normale dans le système nerveux central (revue de Alessandri *et al.*, 2004). Ce phénomène semble lié aux propriétés spécifiques du DPA n-6 qui sont différentes de celle du DHA, notamment en ce qui concerne les caractéristiques des membranes cérébrales (environnement protéique, fluidité). Sur un modèle artificiel de membranes de cellules photoréceptrices de la rétine (liposomes intégrant de la rhodopsine et de la phosphodiesterase PDE), il a été démontré que l'activation de la rhodopsine (conversion de la forme I en forme II après photostimulation) et de la PDE était significativement réduite dans les membranes artificielles renfermant de la PC-22:5 n-6 comparativement à la PC-22:6 n-3 (Mitchell *et al.*, 2003). L'absence de la dernière double liaison vers l'extrémité méthyle terminale du DPA n-6 (position n-3) semble être à l'origine de cette moindre activité de cet AGPI. En effet, les membranes artificielles incorporant de la PC-22:5 n-3 présentent une activité en tout point comparable à celle des membranes incorporant du DHA.

Si l'incidence de la déficience est comparable dans les 2 structures en ce qui concerne le DHA et le DPA, des différences apparaissent en ce qui concerne l'AA avec une augmentation significative dans l'hippocampe des rats déficients qui n'est pas observée dans le cortex. Cette différence accentuée d'autant plus le déséquilibre de la balance membranaire entre l'AA et le DHA, avec un rapport AA/DHA de 3,9 dans le cortex et de 7,0 dans l'hippocampe. L'hypothèse d'un métabolisme particulier des AGPI n-6 dans cette zone cérébrale est confortée par l'observation d'une teneur naturellement plus élevée en AA corrélativement à une teneur plus faible en DHA dans l'hippocampe comparativement au cortex (Carrié *et al.*, 2000 ; Poumès-Ballihaut, 2001). Cependant les particularités cyto-architecturales de ces 2 zones sont aussi à considérer.



En revanche, nous n'observons pas de répercussion de la déficience en n-3 sur les concentrations des classes de phospholipides dans les 2 zones cérébrales étudiées. D'autres études ont cependant montré une diminution importante de la quantité de la phosphatidylsérine (-30%) dans cette situation. Celle-ci s'observe cependant exclusivement lorsque la teneur membranaire en DHA est particulièrement affectée, c'est-à-dire dans des modèles de carences multi-générationnelles ou bien encore sur modèle cellulaire (Delion *et al.*, 1997 ; Hamilton *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2010). Dans ce cas particulier, il semble que les enzymes spécifiquement impliquées dans les voies de synthèse des classes de phospholipides présentent une affinité moins importante vis-à-vis du DPA n-6 comparativement au DHA, d'où la diminution de synthèse et donc de la teneur en PS. La PS est synthétisée à partir de la PC et de la PE grâce à l'échange de l'éthanolamine ou de la choline avec la sérine (Tam et Innis, 2006). Dans une situation de carence prononcée en AGPI n-3, les espèces moléculaires de PC et de PE renfermant du 22:5 n-6 (majoritairement les espèces 18:0-22:5 n-6) sont de mauvais substrats pour les enzymes de synthèse, d'où la réduction de la synthèse spécifique de la PS. L'hypothèse que le pool de 18:0-22:6 n-3 associé à la PC et à la PE ait été insuffisamment altéré par une déficience de 1<sup>ère</sup> génération, préservant de ce fait la voie de synthèse de la PS, peut expliquer que nous n'ayons pas observé dans cette étude d'effet de la déficience sur la concentration de PS dans les 2 zones cérébrales.

- Supplémentation en DHA

Avec l'apport alimentaire en AGPI à longue chaîne de la série n-3 (DHA+EPA) sous la forme d'huile de thon, des différences marquées apparaissent entre les 2 zones cérébrales qui se traduisent notamment par une augmentation de la teneur en DHA dans l'hippocampe, tandis que le cortex ne montre aucun changement comparativement au cortex des animaux recevant le régime équilibré. Ces observations s'expliquent si on considère que l'incorporation de DHA dans le cortex a atteint son maximum avec l'apport de l'acide  $\alpha$ -linoléique via le régime équilibré, alors que l'hippocampe atteindrait son plafond d'incorporation uniquement lorsque le DHA préformé est apporté dans le régime alimentaire. Les travaux d'Alessandri *et al.* (2003) ont montré des avidités pour le DHA équivalentes pour les 2 structures (hippocampe et cortex). La différence d'incorporation du DHA dans l'hippocampe par rapport au cortex pourrait s'expliquer par un transfert différent

du DHA à travers la BHE, et surtout par les différences structurales et cellulaires qui font que l'hippocampe s'enrichit un peu moins en DHA que le cortex.

La diminution relative de l'acide arachidonique (plus importante dans le cortex que dans l'hippocampe) pourrait s'expliquer par un apport moindre du précurseur, le 18:2n-6, dans le régime supplémentation (15,6% des AG contre 22% dans le régime équilibré). Cependant cette teneur est estimée suffisante pour satisfaire les besoins de l'organisme en AGPI n-6 (Bourre *et al.*, 1990). Par ailleurs, l'huile de thon apporte en plus des AGPI n-3 à longue chaîne une quantité d'AA préformé non négligeable qui cependant ne permet pas de maintenir constante la composition membranaire en AGPI n-6. Ces résultats tendent à montrer qu'au niveau cérébral la composition en AGPI reste constante et s'équilibre entre les n-6 et les n-3. Le cortex riche en n-3 voit sa teneur diminuée en n-6. Par contre l'hippocampe riche en n-6, s'enrichit en n-3.

La différence semble s'expliquer par une capacité de transfert propre aux structures qui diffèrent par leur équipement enzymatique ou par une caractéristique intrinsèque. En dehors des couches cellulaires spécifiques à chaque structure, les interconnexions (afférences, efférences, collatérales) plus riches dans les couches corticales que dans celles de l'hippocampe sont également sources de différences. Ainsi, la composition lipidique des synaptosomes dans ces 2 structures (Poumès-Ballihaut, 2001) est comparable pour la PC et la PE. Cette observation tend à prouver qu'au-delà d'un foisonnement plus grand de synapses, la « qualité » lipidique distingue également ces 2 structures.

## 2/Consommation de glucose (imagerie TEP) et expression des transporteurs GLUT

La consommation cérébrale du glucose est due pour l'essentiel au traitement de l'information par les neurones, notamment au niveau des synapses. Toutes les techniques d'imagerie fonctionnelle cérébrale reposent sur le principe biologique de la consommation d'énergie liée à l'activité neuronale. Cette consommation d'énergie peut être visualisée et quantifiée par différentes méthodologies, telles que l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) ou encore la tomographie par émission de positons (TEP). La TEP permet de quantifier le niveau d'activité cérébrale et sa localisation, *via* la mesure de la consommation de glucose et/ou d'oxygène radiomarqués délivrés aux tissus par la

circulation sanguine, et d'évaluer ainsi l'accumulation de l'isotope dans certaines zones cérébrales (Rosa-Neto et Leuzy, 2008). Par exemple, l'accumulation d'oxygène 15 délivré par de l'eau marquée traduit la réponse hémodynamique associée à l'activation neuronale, c'est-à-dire une augmentation locale du débit sanguin cérébral qui se produit lorsqu'une zone du cerveau est activée. L'accumulation cérébrale d'un analogue non-métabolisable du glucose marqué au fluor 18, le  $^{18}\text{F}$ -2-déoxyglucose, représente le niveau d'utilisation cérébrale du glucose et permet de quantifier l'activité cérébrale au repos ou en situation d'activation. Ces différentes techniques sont utilisées en clinique humaine et ont permis de montrer que les signaux d'imagerie TEP sont fortement modifiés dans de nombreuses maladies neurodégénératives et neuropsychiatriques, comme par exemple la maladie d'Alzheimer, la dépression, la schizophrénie ou l'épilepsie. Une réduction moyenne de 20 à 25% du niveau d'utilisation cérébrale du glucose est caractéristique des patients touchés par la maladie d'Alzheimer, et concerne en particulier certaines régions corticales comme les cortex cingulaire, frontal, temporal et pariétal (revue de Cunnane *et al.*, 2011). Chez des patients dépressifs sans traitement thérapeutique, un hypométabolisme du glucose a été également retrouvé dans plusieurs zones corticales pré-frontales (dorso-médiane et dorso-antérolatérale (Drevets, 2000).

Les données expérimentales montrant que l'apport alimentaire en AGPI n-3 peut moduler le métabolisme cérébral du glucose, et donc la biodisponibilité d'ATP, sont peu nombreuses. Elles ont fait seulement l'objet de 3 publications en ce qui concerne la mesure de l'utilisation cérébrale de glucose chez l'animal. Les premières données expérimentales sont celles acquises chez le rat par notre équipe, qui ont montré qu'un déficit d'apport alimentaire en AGPI n-3 pouvait induire un hypométabolisme cérébral du glucose (Ximenes *et al.*, 2002). Ces données ont été obtenues en utilisant la méthode de consommation du 2-déoxyglucose marqué au carbone 14 et couplée à l'autoradiographie sur coupes cérébrales comme décrite par Sokoloff *et al.* (1977). Ainsi chez les animaux déficients en n-3 placés en situation de repos, il apparaît clairement que la consommation de glucose diminue très fortement (-35%) dans plusieurs zones cérébrales, notamment le cortex et l'hippocampe. Les données ultérieures sont issues d'une étude d'observation conduite chez 29 patients dépressifs qui a notamment permis de démontrer l'existence de corrélation entre le statut en AGPI plasmatique (DHA, AA) et le niveau d'utilisation cérébrale de glucose (CMRg)

(Sublette *et al.*, 2009). Elles ont été obtenues par une approche d'imagerie fonctionnelle TEP utilisant le FDG comme traceur. Les principaux résultats mettent en évidence que la teneur plasmatique en DHA, et également en AA, est corrélée positivement avec le CMRg dans le cortex temporo-pariétal des patients constituant cette petite cohorte. Ces données suggèrent implicitement que les patients ayant un statut sanguin peu élevé en AGPI présentent un hypométabolisme du glucose dans cette région cérébrale. En revanche, la teneur en DHA est corrélée de façon négative au CMRg dans le cortex pré-frontal et le cingulaire antérieur suggérant un hypermétabolisme glucidique dans ces régions associées à un statut plus élevé en DHA. Aucune corrélation n'est mise en évidence en ce qui concerne la teneur plasmatique en EPA. Ces corrélations inverses peuvent s'expliquer par les différentes régulations positives ou négatives qu'exercent les zones cérébrales les unes sur les autres, l'hypométabolisme de l'une, liée au statut en DHA, pouvant par contre coup entraîner une activation métabolique de l'autre. Des études menées chez l'homme ont montré que des patients ayant des lésions corticales préfrontales ou schizophrènes, présentent une augmentation de l'activité du cortex préfrontal associée à une diminution de l'activité dans la zone corticale temporale. Cette étude prospective demanderait à être validée sur une cohorte plus importante qui pourrait alors mesurer en parallèle la consommation en AGPI n-3 et le niveau de dépression. Les dernières données publiées sur ce sujet sont issues d'une étude plus ancienne conduite chez le singe qui visait à évaluer les effets d'une consommation de DHA sur l'utilisation cérébrale de glucose (FDG et TEP) chez l'animal âgé au repos ou en situation d'activation (stimulation vibrotactile) (Tsukada *et al.*, 2000). L'absence d'effets sur les paramètres mesurés est à imputer à la très faible durée de l'intervention nutritionnelle, 4 semaines.

Afin de valider les premières données expérimentales que nous avons acquises et y apporter une dimension temporelle (cinétique), nous avons mené une étude visant à évaluer l'impact d'une déficience alimentaire chronique en AGPI n-3 sur la consommation cérébrale de glucose en utilisant la technique d'imagerie TEP. Pour ce faire nous avons utilisé le radio-traceur <sup>18</sup>FDG, analogue non métabolisable du glucose, qui nous permet grâce à l'imagerie fonctionnelle d'obtenir une cinétique de la consommation cérébrale de glucose. Les données expérimentales recueillies confirment l'existence d'un hypométabolisme glucidique cérébral chez les animaux déficients en AGPI n-3. En effet, chez ces animaux nous trouvons une

diminution d'environ 11% de la valeur de consommation maximale du glucose ( $SUV_{Max}$  à 45 minutes) par rapport aux animaux témoins. Il est utile de rappeler que les valeurs d'utilisation du FDG sont exprimées en SUV (*Standardized Uptake Value*) et qu'elles ont été déterminées au niveau du cerveau total, témoignant donc d'une altération de l'ensemble du tissu nerveux. Le SUV est l'index le plus souvent utilisé pour caractériser le niveau d'incorporation du FDG en TEP car la fixation du traceur est normalisée par la dose injectée et rapportée au poids du patient. Par ailleurs pour établir une proportionnalité entre l'intensité du signal mesuré et la concentration tissulaire du radio-traceur, on utilise un objet (mire) dans lequel se trouve une concentration de traceur connue (Buvat, 2007). De façon originale, nos données montrent également que la vitesse d'entrée du glucose dans sa phase initiale est diminuée d'environ 27% chez les animaux déficients, vitesse d'entrée dont on sait qu'elle est liée à la biodisponibilité des transporteurs GLUTs (GLUT1 et GLUT3).

Si nos résultats confirment les premières données publiées, ils indiquent toutefois une moindre réduction de la consommation maximale du glucose chez les animaux déficients. Ceci pourrait s'expliquer par la différence de biodisponibilité du traceur injecté, du fait que l'injection du radio-traceur a été effectuée en intra-musculaire dans l'étude précédente et en intra-veineuse dans notre étude. L'explication la plus probable serait liée à l'utilisation spécifique d'un anesthésiant gazeux (isoflurane) pour l'imagerie TEP qui est susceptible de diminuer la vitesse d'utilisation cérébrale du glucose. En effet pour des questions d'éthique et de commodité, les animaux vigiles ne peuvent être utilisés pour réaliser des analyses TEP ; ils sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane afin d'être immobilisés. Or, l'utilisation d'anesthésiants provoque des modifications d'un grand nombre de paramètres biologiques au niveau cérébral, par exemple au niveau de la neurotransmission dopaminergique (Momosaki *et al.*, 2004). Une étude chez l'Homme a mis en évidence que l'anesthésie par l'halothane diminue de 40% le métabolisme cérébral et l'utilisation du glucose mesurée par imagerie FDG-TEP, l'isoflurane et le propofol présentant des effets similaires sur ce paramètre (Alkire *et al.*, 1999). Des travaux réalisés chez l'animal montrent au contraire des différences de réponse en fonction de l'anesthésiant utilisé, le propofol semblant être le moins altérant (Matsumara *et al.*, 2003). Des données plus anciennes montrent la difficulté du choix de l'anesthésiant (Ori *et al.*, 1986). Une anesthésie à l'isoflurane (1,5%) peut chez le rat induire une inhibition de l'utilisation du glucose au niveau des zones corticales et de la

couche CA1 de l'hippocampe (entre -20 et -50%) et au contraire, une augmentation de cette utilisation dans d'autres zones comme par exemple la couche CA3. Afin de s'affranchir de ces effets perturbateurs, il serait possible de mettre en place un système de contention spécifique permettant la fixation de la tête du rat par des barres de contention. Le reste du corps de l'animal reste alors assez libre ce qui permet après un entraînement régulier de l'animal (habituation) de limiter le stress provoqué par les appareils de mesure et la manipulation (Momosaki *et al.*, 2004).

Afin de provoquer une activation neuronale chez les animaux et pouvoir disposer notamment d'éléments de comparaison avec l'étude transcriptomique, nous avons placé les rats dans un environnement enrichi sur une durée de 1 heure. Le but de ce protocole était de déterminer si les différences dues au régime observées chez l'animal au repos se maintenaient en situation d'activation. Il est important de rappeler que lors d'une activation neuronale, induite par exemple lors d'une stimulation des vibrisses, la consommation de glucose n'est augmentée que de 15 à 20% dans les zones cérébrales activées (Cholet *et al.*, 1997). Pour notre étude, lors de la stimulation induite par l'environnement enrichi, nous avons obtenu des valeurs de  $SUV_{Max}$  inférieures à celles déterminées en condition basale. Cependant nous ne pouvons comparer ces deux conditions car la quantité de radio-traceur injectée au départ n'était pas la même et le délai écoulé entre l'injection du traceur et les mesures était 2 fois plus important. Malgré l'activation, qui permet une meilleure fixation du traceur et donc normalement une meilleure définition, nous n'avons pu déterminer finement les différentes zones cérébrales d'intérêt d'où une valeur d'activité mesurée sur le cerveau dans sa globalité.

Les données recueillies ne permettent pas de mettre en évidence un effet de la déficience sur la consommation de glucose en situation d'activation, entraînant la conclusion que l'hypométabolisme cérébral de glucose induit par une déficience alimentaire en AGPI n-3 se manifeste essentiellement en situation basale. On peut cependant nuancer cette conclusion, car la durée importante qui s'est écoulée après l'injection du radio-traceur peut atténuer l'impact initial de la stimulation. En effet, les rats après l'injection du  $^{18}FDG$ , sont soumis à un environnement enrichi pendant 1h et ensuite anesthésiés afin d'être placés sous la caméra pour y être scannés. Le scan dure 1h15 et le résultat obtenu est en réalité une valeur moyenne mesurée finalement 2h15 après l'injection du  $^{18}FDG$ . En situation

basale, on a pu observer que la consommation de glucose chez les rats témoins atteint un plateau au bout de 45 minutes et que les rats déficients tendent vers ce plateau. Il n'est donc pas impossible que les valeurs plateau se rejoignent (dans ces conditions expérimentales) pour les deux groupes d'animaux. Des conditions expérimentales peut-être plus appropriées viseraient à mettre en place directement sous la caméra un test d'activation des zones cérébrales d'intérêt. Le problème de la nature de l'anesthésiant reste également posé. Dans notre cas et considérant les 2 zones cérébrales étudiées, le choix du propofol s'avérerait moins contraignant pour le métabolisme énergétique mais resterait problématique du point de vue technique (pose d'une canule caudale supplémentaire).

L'hypométabolisme cérébral du glucose que nous avons mis en évidence chez les animaux déficients en AGPI n-3 en situation basale, notamment la réduction de la vitesse d'entrée de glucose, suggère une moindre expression des transporteurs cérébraux GLUTs, en particulier des isoformes endothéliale et astrocytaire de GLUT1 ainsi que de l'isoforme neuronale GLUT3. On sait en effet que l'utilisation cérébrale de glucose est intimement liée à la disponibilité de ces 3 transporteurs majeurs. Une étude réalisée chez le rat mesurant à la fois la densité tissulaire de GLUT1 dans plusieurs zones cérébrales (47 structures) et le niveau d'utilisation de glucose (méthode 2-DG-autoradiographie) a ainsi montré une corrélation positive très significative entre ces 2 paramètres (Duelli et Kuschinsky, 2001). Cette relation est également retrouvée pour le transporteur neuronal GLUT3 mais elle est moins marquée. La variation de la densité du transporteur GLUT1 dans les zones cérébrales est associée à celle des capillaires cérébraux. Ces auteurs ont retrouvé les mêmes corrélations avec l'activité spécifique de transport de glucose mesurée par la technique du 3-O-methylglucose (3-O-MG), témoignant de l'importance de l'étape de transport membranaire du glucose dans l'activité métabolique du tissu cérébral. Rappelons que cet analogue du glucose, contrairement au 2-DG, n'est pas métabolisé par les cellules car ce n'est pas un substrat de la première étape de la glycolyse.

Dans notre étude, une réduction de 33% de l'expression génique de GLUT1 chez l'animal déficient au repos a été observée, confortant l'hypothèse émise à l'origine de ce travail. Ces résultats sont en accord avec les données de Hichami *et al.* (2007) qui montrent chez le rat déficient en n-3 en situation basale, une diminution d'environ 50% de l'expression de l'ARNm de GLUT1 dans le cortex piriforme et seulement une tendance (non significative)

à la diminution dans le néocortex et le lobe olfactif. Précisons que des données précédentes n'avaient pas mis en évidence de réduction significative de l'expression de ce transporteur (Pifferi *et al.*, 2005), probablement en raison de la variabilité de la PCR quantitative "classique" utilisée à ce moment, qui ne permettait pas de détecter des variations de faibles amplitudes (inférieures à 50%). Dans ce travail, nous avons utilisé la technique de TLDA qui présente une variabilité 2 fois moins importante que la PCR "classique", ce qui permet de détecter de façon significative des différences d'expression de faible amplitude, telle que celle de 33% que nous avons mesurée entre les rats déficients et témoins. Toutefois, l'effet de la déficience sur l'expression de GLUT1 est spécifique de la structure cérébrale, puisque aucune répercussion n'est observée sur l'expression de ce transporteur au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe. L'explication de cette particularité est complexe. On peut noter que sur le plan du métabolisme du glucose, l'hippocampe se différencie du cortex par le niveau d'expression de l'ARNm de GLUT1 qui y est beaucoup plus abondant (chez les témoins  $22,9 \pm 1,8/15,7 \pm 2,4$ ) (Annexe 6). En revanche, l'utilisation du glucose y est plus faible alors que la densité de GLUT1 reste comparable à celle du cortex (Ori *et al.*, 1986 ; Choeiri *et al.*, 2005). En ce qui concerne le deuxième transporteur majeur de glucose cérébral, GLUT3, il apparaît clairement que la déficience n'a aucun impact sur son niveau d'expression. Cette observation rejoint l'ensemble des données publiées par l'équipe qui montrent que la régulation de GLUT3, à travers l'expression de sa protéine, n'est nullement impliquée dans la réduction de la consommation cérébrale de glucose chez les animaux déficients.

D'un autre côté, nos données expérimentales soulignent qu'une supplémentation alimentaire en DHA préformé n'a aucune répercussion, comparativement aux animaux témoins n'ayant reçu que le précurseur des n-3, sur le niveau d'expression des transporteurs GLUTs en situation basale et notamment sur GLUT1. L'explication la plus probable est que le statut cérébral en DHA n'a pas été modifié par la supplémentation en DHA comparativement à celui des animaux ayant ingéré le régime équilibré. En définitive, ces résultats étayent l'hypothèse d'un lien étroit entre la concentration membranaire en DHA et l'expression de GLUT1. Elles rejoignent les données obtenues sur les cultures primaires de cellules endothéliales démontrant un effet direct du DHA à des doses physiologiques (15 $\mu$ M) sur l'expression de GLUT1 et l'activité de transport du glucose (Pifferi *et al.*, 2010). Cette



stimulation semble spécifique des AGPI n-3 car si l'EPA possède des propriétés similaires, l'AA en revanche ne semble pas moduler ces paramètres. Nos données *in vitro* en condition de supplémentation à court terme (30µM de DHA pendant 30 minutes) des astrocytes mettent en évidence un effet stimulant du DHA sur l'utilisation du glucose (+38%) ainsi que sur l'expression protéique du transporteur GLUT1 (+30%). Cet effet du DHA est différent de celui de l'AA car ce dernier stimule bien l'utilisation du glucose mais sans perturber l'expression du transporteur. Lors de l'ajout de glutamate dans le milieu de culture qui mime une activation glutamatergique, il y a une augmentation de l'utilisation du glucose couplée à celle de l'expression du transporteur GLUT1. Il semblerait donc que le DHA exerce un effet sur le métabolisme énergétique glucidique du cerveau en modulant directement l'utilisation et le transport de glucose via l'expression de GLUT1 (endothélial et astrocytaire). Un travail récemment publié (Aas *et al.*, 2006), réalisé sur des cellules de muscles squelettiques, montre que la supplémentation en EPA à des concentrations élevées (100-600 µM) stimule également l'utilisation du glucose associée à une augmentation des ARNm du transporteur GLUT1. L'ensemble de ces données suggèrent donc que les AGPI n-3 ont la capacité de moduler le captage basal du glucose en régulant l'expression du transporteur GLUT1.

Il est admis que l'activation neuronale augmente l'utilisation cérébrale de glucose dans les zones cérébrales actives, un effet en partie lié à l'augmentation d'expression du transporteur GLUT1. L'équipe de Choeiri (2005) a montré que le niveau d'expression de GLUT1 (ARNm) est variable (« plastique ») et répond à la demande métabolique des cellules nerveuses activées. Cette étude a été conduite chez la souris adulte (âgée de 10 à 15 semaines) soumise à un test de conditionnement opérant qui consiste à appuyer sur un levier afin d'avoir accès à la nourriture. Celui-ci induit une activation spécifique du cortex moteur et de la couche CA1 de l'hippocampe. Dans ces conditions, l'expression génique de GLUT1 est augmentée dans les 2 zones cérébrales (+22%). En revanche, l'expression de GLUT3 reste inchangée en situation d'activation. Les données d'Hichami *et al.* (2007) montrent des résultats similaires pour GLUT1 lors d'un test de discrimination olfactive, soit une augmentation de son expression dans le lobe olfactif et le néocortex des rats en situation d'activation. En accord avec ces résultats, nous mettons en évidence dans ce travail un effet global de l'activation sur l'expression génique de GLUT1 dans les 2 structures (+19% dans le cortex fronto-pariétal et +18% dans la couche CA1 de l'hippocampe), tandis que

l'expression de GLUT3 reste inchangée. Il a été montré que le neurone activé n'est pas capable d'augmenter le niveau d'activité de la glycolyse, ni le captage de glucose. La principale explication est que l'activité de la PFK est 2 fois moins importante que dans l'astrocyte du fait de l'absence de l'enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase, isoforme 3 (PFKFB3) qui permet l'activation de la glycolyse via la PFK (Bolanos *et al.*, 2010). Ceci conduit donc le neurone à utiliser un substrat énergétique alternatif, le lactate.

Ainsi, il apparaît clairement qu'en situation d'activation, l'altération de l'expression de GLUT1 dans le cortex fronto-pariétal des animaux déficients en n-3 se maintient (diminution de 19% par rapport aux témoins activés). Il est à noter que le niveau d'expression atteint par les animaux déficients devient sous activation équivalent à celui des animaux témoins en situation basale.

Les données précédemment acquises chez les animaux déficients en n-3 ont montré une diminution de l'expression protéique des 2 isoformes de GLUT1, dans l'homogénat de cortex total et dans les capillaires cérébraux isolés (Pifferi *et al.*, 2005). Nos résultats ne montrent pas de tels effets sur l'expression protéique de GLUT1 (forme astrocytaire de 45kDa) au niveau du cortex fronto-pariétal et de la couche CA1 de l'hippocampe, ni sur l'expression de l'isoforme GLUT1 55kDa au niveau des capillaires cérébraux (résultats non montrés). Le fait que nous ne voyons pas de différence peut être notamment imputé à la technique de Western Blot et plus précisément à sa sensibilité et variabilité qui ne permettent pas de mesurer de façon reproductible de si faibles variations (20-30%). Par ailleurs, nous n'observons pas d'augmentation de la protéine GLUT1 en situation d'activation neuronale. Cette absence d'effet peut résulter d'un décalage de synthèse et/ou de turn-over entre l'ARNm et la protéine. Le temps d'activation que nous avons testé (1h) semble suffisant pour détecter l'induction de la transcription mais inadapté en ce qui concerne l'expression protéique. De plus, la variation de l'expression protéique de GLUT1 en situation d'activation entre les animaux soumis à un même test d'activation est considérable, d'où une variabilité intrinsèque qui ne permet pas de détecter de différence de faible amplitude entre les animaux (Choeiri *et al.*, 2005). Pour remédier à ce problème, il aurait fallu intégrer dans notre étude un plus grand nombre d'animaux dans chaque groupe alimentaire ( $n > 10$ ), ce qui aurait permis la constitution de sous-groupes d'animaux selon leur niveau de réponse (positive ou négative) à l'activation.

### 3) Déficience en n-3 et fonctionnement de la synapse glutamatergique

#### ***Métabolisme du glutamate - Modification du cycle du glutamate-glutamine***

Dans les 2 zones cérébrales étudiées, l'analyse de l'expression des gènes indique que la déficience alimentaire en AGPI n-3 modifie le fonctionnement de la synapse glutamatergique. En effet, il est remarqué une augmentation du niveau des ARNm codant pour les 2 transporteurs astrocytaires de glutamate GLT1 et GLAST. Toutefois, il apparaît clairement que les variations observées sont beaucoup plus marquées au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe (+77% et +45% pour GLT1 et GLAST, respectivement) qu'au niveau du cortex. Dans cette zone cérébrale, on peut considérer que la modification du métabolisme glutamatergique y est très modérée car les variations d'expression des gènes codant pour les 2 transporteurs sont beaucoup plus faibles en terme d'amplitude et ne sont significatives que pour GLT1 (+18%). Les modifications d'expression de GLT1 et de GLAST sont systématiquement associées à une augmentation de l'expression d'une des 2 isoformes de la sous-unité catalytique de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. Ces modifications simultanées renforcent l'hypothèse que l'activité de transport astrocytaire du glutamate est augmentée au niveau de la synapse glutamatergique hippocampique chez les animaux déficients en AGPI n-3. Rappelons que les transporteurs GLT1 et GLAST font partie de la classe des transporteurs du glutamate  $\text{Na}^+$ -dépendants à haute affinité ( $1\mu\text{M} < K_m < 100\mu\text{M}$ ) qui comporte 3 types de transporteurs : EAAC1 exprimé au niveau neuronal dans divers zones cérébrales dont l'hippocampe, le cortex, le bulbe olfactif le striatum ; GLAST et GLT1 exprimés au niveau astrocytaire. Leur importance a été mis en avant avec l'utilisation d'homogénats cellulaires issus de souris KO pour GLT1 et GLAST (Tanaka *et al.*, 1997). Il est alors observé une diminution importante de l'activité de captage du glutamate puisqu'elle ne représente plus que 5% de l'activité mesurée chez l'animal témoin. De plus les animaux KO pour ces transporteurs présentent des troubles neurologiques importantes associées à des lésions cérébrales au niveau notamment de l'hippocampe et du cortex. Au cours du développement, le profil d'expression de ces 2 transporteurs est différent, avec GLAST exprimé précocement dès la période de développement, alors que GLT1 est retrouvé en quantité plus abondante plus tardivement. Les études de Matsugami *et al.* (2006) ont montré l'importance de ces 2 transporteurs dans le développement en utilisant des souris KO pour GLT1 et GLAST. Ces

animaux présentent un développement cérébral anormal et meurent *in utero*. Par ailleurs, il a été montré sur des cultures primaires d'astrocytes que GLT1 était peu exprimé comparativement à GLAST. Dans des systèmes de co-culture neurones-astrocytes, l'expression de GLT1 est alors induite et celle de GLAST est considérablement augmentée. Il semblerait donc que la régulation de l'expression de ces transporteurs soit régulé par des facteurs neuronaux encore non identifiés (Swanson *et al.*, 1997 ; Schlag *et al.*, 1998). On sait toutefois que les facteurs de croissance comme l'EGF, le TNF- $\alpha$  ou l'AMPc induisent l'expression de GLT1 sur des astrocytes en culture (Zelenaia *et al.*, 2000).

L'augmentation supposée de l'activité de captage du glutamate par les astrocytes des animaux déficients en n-3, résultant de l'augmentation de l'expression de GLAST et GLT1, peut être mise en parallèle avec la diminution de la teneur membranaire cérébrale en DHA. En effet, des études conduites à la fois *in vivo* et *in vitro* ont avancé l'hypothèse que le DHA pouvait exercer une action inhibitrice sur cette activité. Ainsi sur des suspensions membranaires isolées de cortex ou d'hippocampe d'animaux déficients en n-3, il a été montré une diminution de 30% des paramètres de cinétiques de capture du D-[3H]aspartate, analogue du glutamate, lors de l'ajout de 60 $\mu$ M de DHA pendant 10min par rapport à des suspensions isolées d'animaux témoins (Grintal *et al.*, 2009). Des études conduites en parallèle sur des cultures d'astrocytes, permettent de retrouver cet effet inhibiteur du DHA puisque l'ajout de ce dernier dans le milieu de culture à la dose de 60 $\mu$ M induit une diminution de plus de 50% du taux de capture de l'aspartate (Grintal *et al.*, 2009). Cependant, il n'y a pas de mise en évidence de modifications significatives de l'expression protéique de ces 2 transporteurs. Cette action est spécifique des AGPI n-3 à longue chaîne puisque l'ajout d'AA (3 à 60 $\mu$ M) n'a aucune influence sur ce paramètre tant sur les astrocytes que sur les suspensions membranaires corticales. Pour les auteurs, cette inhibition par le DHA favoriserait, en maintenant plus longtemps la concentration de glutamate dans la fente synaptique, l'activité de la neurotransmission glutamatergique en prolongeant l'activation des récepteurs glutamatergiques post-synaptiques. De ce fait, les processus de plasticité synaptique impliqués dans les phénomènes de mémorisation seraient amplifiés.

Comme décrit précédemment, il a été démontré pour la synapse glutamatergique que le transport de glutamate est couplée à l'activation de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, dont nous

avons constaté une augmentation de l'expression de 2 isoformes composant la sous-unité catalytique. La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase catalyse l'échange de 3 ions  $\text{Na}^+$  contre 2 ions  $\text{K}^+$  à travers la membrane plasmique de presque toutes les cellules animales et est composée de plusieurs sous-unités :

- la sous-unité  $\alpha$ , sous-unité catalytique comportant 10 segments transmembranaires. Elle est présente sous 4 isoformes différents de poids moléculaires de 110kDa environ.

- la sous-unité  $\beta$  plus petite (60kDa) et hautement glycosylée assure le repliement et l'ancrage appropriés de la sous-unité  $\alpha$  dans la membrane. Elle est aussi impliquée dans la liaison de l'ouabaine, l'inhibiteur de la pompe à sodium. Pour le moment, 3 isoformes sont connues.

Dans notre étude nous observons une augmentation des 2 isoformes, Atp1a2 et Atp1a3, lors de la déficience. Atp1a2, plutôt représenté majoritairement au niveau astrocytaire, paraît importante dans le maintien de la concentration en  $\text{K}^+$  dans le parenchyme alors que l'Atp1a3, majoritairement neuronale et localisée au niveau postsynaptique, jouerait un rôle dans le processus de neurotransmission (Lingrel *et al.*, 2007). Cependant on ne peut affirmer que les changements mis en évidence concernent exclusivement la pompe astrocytaire. Il existe une seconde pompe au niveau neuronal, dont le rôle est de rétablir les mouvements ioniques  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  lors de la dépolarisation de la membrane neuronale, suite à une stimulation. Cette dépolarisation conduit à la libération de glutamate par le neurone provoquant une activation des récepteurs au glutamate post-synaptiques, GLURs, qui permettent l'entrée d'ions  $\text{Na}^+$  et ainsi déclenche l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (DiNuzzo *et al.*, 2011). Cependant l'hypothèse d'une modification de la pompe neuronale chez les animaux déficients en AGPI n-3, malgré notre observation mettant en évidence une augmentation de l'expression de la sous-unité Atp1a3, semble peu probable. En effet, des travaux anciens ont montré, au niveau des terminaisons nerveuses (neurone), une diminution de 50% de l'activité de cette pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase chez ces animaux (Bourre *et al.*, 1989).

Le troisième acteur de ce cycle du glutamate qui est perturbé par la déficience en AGPI n-3 est la glutamine synthétase (Gls), enzyme qui permet la synthèse de glutamine à partir du glutamate au niveau astrocytaire. Cette réaction est consommatrice d'ATP afin de permettre la formation d'un produit intermédiaire, le  $\gamma$ -glutamyl phosphate, qui est

beaucoup plus réactif que le glutamate. Dans notre étude l'expression génique de cette enzyme est augmentée de 42% au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe et ne varie pas significativement dans le cortex. La glutamine synthétase est localisée dans les astrocytes dont l'un des rôles est de protéger le neurone en participant activement au captage du glutamate présent dans la fente synaptique ainsi qu'à celui du recyclage de ce neurotransmetteur vers le neurone. Il est acquis que le neurone est dépendant de l'apport en glutamine via l'astrocyte pour se fournir en glutamate du fait d'une voie de synthèse in situ du glutamate à partir du glucose peu active (Hertz et Zielke, 2004). L'augmentation de l'expression de la Gls chez les animaux déficients soulignerait un mécanisme de recyclage plus actif du glutamate vers le neurone afin de préserver le pool neuronal. La glutamine est ensuite redistribuée aux neurones, la Gls favoriserait ainsi le maintien d'une concentration neuronale optimale en glutamate. Dans le neurone, la glutamine est catabolisée en glutamate par la glutaminase. Cette réaction ne consomme pas d'énergie mais libère une molécule d'ammoniac. Dans notre cas, l'expression génique de cette enzyme neuronale n'est pas modifiée par la déficience.

### ***Métabolisme du glutamate – Conséquences sur l'énergétique***

Comme nous l'avons décrit précédemment, la capture du glutamate est un processus qui s'accompagne de l'entrée de 3 Na<sup>+</sup> et la sortie d'1 K<sup>+</sup> qui va provoquer l'activation spécifique de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase qui permet de rétablir les gradients de concentration de ces 2 ions et qui est très consommatrice d'énergie. Dans notre étude l'expression des sous-unités de cette pompe est augmentée chez les animaux déficients. Ces derniers présentent également une réduction globale de l'utilisation du glucose comme l'ont montré nos données d'imagerie TEP et celles plus anciennes utilisant la méthode 2DG couplée à l'autoradiographie (Ximenes *et al.*, 2002).

L'hypothèse que nous proposons est que dans ces conditions, l'entrée de glutamate favoriserait alors l'utilisation de glycogène comme source d'énergie. Des études *in vitro*, sur un modèle de co-culture astrocyte-neurone, ont en effet montré une mobilisation du glycogène suite à une exposition à un analogue non-métabolisable du glutamate, le D-aspartate (Sickman *et al.*, 2009). De plus il a été mis en évidence que l'activation de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase provoquait une forte consommation d'ATP avec une augmentation de

la concentration intracellulaire d'AMP et Pi. Cette augmentation est connue pour activer la glycogénolyse et donc à la mobilisation (processus très rapide) du glycogène stocké dans la cellule. En effet, l'astrocyte se distingue des autres cellules nerveuses par sa particularité à renfermer une quantité importante de glycogène (7 fois plus importante que celle du glucose intracellulaire). Cette source est localisée spécifiquement dans les pieds astrocytaires entourant les synapses, zones subcellulaires où la demande d'énergie est importante (Oz *et al.*, 2007). Si le rôle du glycogène reste encore peu exploré, il est proposé que sa mobilisation ait lieu surtout en situation d'activation prolongée (schéma de Magistretti) ou en cas d'hypoglycémie, 2 situations lors desquelles la concentration en glucose circulant devient insuffisante. Les animaux déficients de notre étude se retrouvent dans ce cas d'hypométabolisme glucidique et donc en déficit pour la production d'ATP. La seule source d'énergie disponible pour pallier à cette demande d'ATP serait alors le glycogène mis en réserve dont la mobilisation va conduire à la production de glucose-6-phosphate qui va pouvoir alors alimenter la voie de la glycolyse. L'augmentation de l'expression de plusieurs enzymes clés de cette voie (Hk, Gpi, Pfkp), afin de fournir du pyruvate au Cycle de Krebs et permettre la production d'ATP par la voie de phosphorylation oxydative, sont alors en accord avec notre première hypothèse avancée. Cette hypothèse est également renforcée par l'augmentation de l'expression génique des plusieurs enzymes du cycle de Krebs et de la voie mitochondriale de phosphorylation oxydative. Ainsi, nos résultats montrent pour le cycle de Krebs une augmentation (+71%) de l'expression de l'isoforme 2 de la malate déshydrogénase (Mdh2) et de la deuxième isoforme étudiée, Mdh1 (+23%, non significative). Ils mettent également en évidence pour la voie de phosphorylation oxydative une augmentation de l'expression d'une sous-unité enzymatique du complexe IV (+95%) et également complexe V (82%). Le fait que l'ensemble de ces variations soient exclusivement remarquées au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe, zone pour laquelle la déficience affecte le plus le métabolisme du glutamate et la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, soulignent que les modifications de l'activité de la synapse glutamatergique affecte essentiellement cette zone cérébrale chez les animaux déficients en AGPI n-3.

Cependant on peut se poser la question suivante : Nos animaux déficients présentent-ils une concentration astrocytaire en glycogène suffisante consécutive à leur hypométabolisme glucidique? Ce que nous avons observé est que l'expression génique de

l'enzyme régulant la voie de synthèse de glycogène, la Gsk3 ou glycogène synthase kinase, n'est pas modifiée par la déficience alimentaire en AGPI n-3. Si cette absence de variation ne constitue pas une preuve de modification de la voie de la glycogénolyse et de la concentration astrocytaire en glycogène, la mesure de la concentration intracellulaire cérébrale de glycogène permettrait alors d'étayer notre hypothèse.

Le glutamate : substrat énergétique en situation d'hypométabolisme glucidique ?

Par ailleurs, il est connu que le glutamate peut constituer directement un substrat énergétique alternatif au glucose qui est moins disponible chez nos animaux. En forte concentration, le glutamate est en grande partie oxydé à des fins énergétiques (McKenna *et al.*, 2000). Il a été montré que le métabolisme du glycogène est lié à celui du glutamate en tant que substrat énergétique de l'astrocyte via sa métabolisation par le cycle de Krebs après conversion en alpha-cétoglutarate. Ainsi, une inhibition de la voie astrocytaire de recyclage du glutamate en glutamine vers le neurone provoque une diminution de la glycogénolyse et de la glycolyse liée à une utilisation accrue du glutamate comme source d'énergie (Yu *et al.*, 1982). La glutamine mais également le glutamate peuvent être utilisés comme substrats énergétiques alternatifs comme le montre plusieurs études conduites *in vivo* et *in vitro*. Sur des cultures de neurones, les données d'Olstad *et al.* (2007) permettent d'observer une préférence d'utilisation du glutamate par rapport à la glutamine par ces cellules.

Un rôle central de l'astrocyte tel que décrit par Magistretti et Pellerin (couplage neuro-métabolique) est de fournir un substrat alternatif au glucose au neurone, notamment en situation d'activation, le lactate (Figure 14 page 43). Dans le schéma proposé, une fraction du glucose métabolisé conduit à la formation de lactate via l'action de la LDH5 (glycolyse anaérobie) et alimente ainsi le pool de lactate disponible pour le neurone. Il semblerait que la déficience affecte spécifiquement le cycle du lactate au niveau de son transport neuronal car l'expression génique du transporteur MCT2 diminue significativement dans la couche CA1 de l'hippocampe (-38%). La production et le transport de lactate au niveau astrocytaire n'apparaissent pas perturbés, l'expression des 2 isoformes MCT1 et MCT4 ne sont pas modifiées ainsi que celle de la LDH. L'approche *in vitro* de notre étude réalisée sur des cultures d'astrocytes, dans une situation d'activation glutamatergique, montrent une augmentation de la production de lactate sans modification de l'activité de la LDH5 ainsi que



l'expression protéique du transporteur astrocytaire MCT1 qui ne semblent donc pas être des facteurs limitants du métabolisme du lactate astrocytaire. L'hypothèse que l'on peut avancer est que chez les animaux déficients en AGPI n-3, la formation de pyruvate est privilégiée afin de conduire à la formation d'énergie, soit 36 molécules d'ATP/molécule de glucose, par la mitochondrie à la place de la formation du lactate (réaction conduisant seulement à la formation de 2 ATP/molécule de glucose).

#### 4) Supplémentation en DHA et métabolisme énergétique

Nous ne disposons que de peu de données bibliographiques ayant trait aux conséquences d'un apport alimentaire en DHA préformé sur le métabolisme énergétique cérébral (Berger *et al.*, 2002 ; Kitajka *et al.*, 2002 ; Barcelo-Coblijn *et al.*, 2003 ; Kothapalli *et al.*, 2007). Parmi les 4 études publiées ayant choisies une approche transcriptomique, seules les deux études conduites par l'équipe de recherche du Dr Farkas peuvent être comparées aux nôtres (Kitajka *et al.*, 2002 ; Barcelo-Coblijn *et al.*, 2003). Cette équipe a en effet étudié chez le rat au niveau cérébral l'impact d'un apport alimentaire en AGPI n-3 (précurseur et longue chaîne) sur l'expression de 3200 gènes (technique des Microarrays) en modulant l'alimentation de la conception jusqu'à l'âge adulte. Les autres données, dont celles de l'étude de Kothapalli *et al.* (2007), sont en revanche difficilement comparables aux nôtres car elles sont spécifiques à la problématique de la nutrition lactée du nourrisson et ont été obtenues sur un modèle de babouin allaité artificiellement recevant une co-supplémentation en DHA+AA.

Parmi les gènes dont l'expression a été modifiée dans les études conduites par l'équipe de Farkas, les auteurs mettent en avant ceux impliqués dans le métabolisme énergétique et plus précisément dans la voie mitochondriale de phosphorylation oxydative. En effet, ils observent une forte augmentation (d'un facteur 2 à 6) de l'expression des sous-unités suivantes : Uqcrc (complexe III) ; sous-unités I, II et VIc du complexe multi-enzymatique (IV) de la cytochrome c oxydase ; sous-unité d et sous-unité FO impliquée dans le transport de protons de l'ATP synthase. De plus, ils observent des modifications de l'expression du cytochrome b et de la NADH deshydrogénase qui interviennent aussi dans cette voie mitochondriale au niveau des processus de transfert d'électrons d'un complexe à l'autre (Figure 12 page 39). Ainsi les auteurs mettent en évidence une activation marquée du

métabolisme mitochondrial (up-régulation de l'expression des gènes clés), leur suggérant que l'apport alimentaire en AGPI n-3 pourrait optimiser le fonctionnement des processus synaptiques de neurotransmission par une production plus importante d'ATP. Comme le mode d'action des AGPI sur la régulation de l'expression de ces gènes et plus généralement des gènes du cerveau sont encore mal connus, ces auteurs suggèrent notamment l'implication des FABPs et de facteurs de transcription tels que les PPARs, LXR, HNF-4 ou SREBPs.

Cependant, ces deux études présentent des biais expérimentaux importants et posent des problèmes d'interprétation. Ainsi les analyses ont été effectuées sur du cerveau total ; or à travers nos propres résultats on a pu remarquer des différences de variations de réponse d'expression entre nos 2 zones cérébrales d'intérêt. Considérant l'amplitude des effets rapportés qui touchent le cerveau dans sa globalité et concernent aussi bien l'apport alimentaire en ALA qu'en DHA, il apparaît que l'effet n'est pas directement lié aux propriétés fonctionnelles spécifiques des AGPI n-3. A ce titre, les auteurs n'observent pas de répercussion sur le statut cérébral en DHA rendant alors difficile l'interprétation des données car ils ne peuvent mettre en parallèle les variations d'expression des gènes à celles du statut lipidique membranaire cérébral. L'absence d'effet sur la teneur en DHA est liée au régime contrôle utilisé qui renferme déjà des quantités d'AGPI n-3 largement au-dessus des quantités nécessaires pour couvrir les besoins spécifiques du cerveau (pour 100 g de régime, 500 mg de LNA et 80 mg de DHA). De plus ces auteurs font des comparaisons sur des expérimentations successives dont les régimes utilisés ne présentent pas les mêmes teneurs de lipides (8% dans la première étude et 5% dans la seconde). Dans ces expériences, plusieurs paramètres de l'alimentation varient simultanément comme la teneur en DHA, la quantité de LA et d'ALA et donc leur ratio. De plus, les régimes supplémentés en AGPI n-3 ne reproduisent aucunement les conditions de consommation constatées chez l'Homme et délivrent des quantités pharmacologiques de ces acides gras. Ils renferment généralement plus de 10 fois plus d'ALA ou de DHA que la quantité nécessaire pour saturer les membranes cérébrales en AGPI n-3, et de 3 à 4 fois plus de DHA que la valeur maximale préconisée en nutrition humaine (AFSSA, 2010). Malgré ces objections, nos résultats sont en partie en accord avec les données de cette équipe car ils montrent que la supplémentation alimentaire en DHA, à des doses physiologiques, provoque une activation de l'expression

génique de plusieurs complexes de la voie de phosphorylation oxydative, activation qui reste plus modérée que celle décrite par l'équipe de Farkas. En terme d'amplitude et de significativité, l'activation que nous observons est plus forte au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe (+64 à +92%) qu'au niveau du cortex (environ +40%). En effet on a pu observer une augmentation de l'expression de Uqcrc2 du complexe III (+81%), de la cytochrome c oxydase Cox6c, complexe IV (+92%), et des 2 sous-unités de l'ATP synthase, Atp5j et Atp5o (+85% et +64%, respectivement). De plus, l'expression des 2 isoformes de la malate deshydrogénase, Mdh1 et 2, augmentent de la même façon (+40% et +89%, respectivement) et ainsi renforce l'activation du métabolisme énergétique mitochondrial. Lorsque les résultats sont analysés en prenant à la fois en compte les valeurs des animaux au repos et activés, il apparaît clairement que tous les complexes de cette voie de phosphorylation présentent une augmentation de leur expression génique (résultats non montrés). Nous observons également une augmentation de l'expression de 2 enzymes de la glycolyse, Hk1 et Pfkfb. Ceci allant dans le même sens que la phosphorylation oxydative qui a besoin d'une quantité plus importante de pyruvate afin de produire de l'ATP. De plus les animaux ne présentent pas de modification de l'expression de GLUT1, ce qui laisse penser que l'alimentation de la voie de la glycolyse est normale pour assurer la production d'ATP. La mesure de l'utilisation cérébrale de glucose soit par imagerie TEP soit par la méthode de 2-DG permettra d'infirmer ou non cette hypothèse.

En plus de ce métabolisme mitochondrial et de la glycolyse, le métabolisme glutamatergique semble affecté par la supplémentation. En effet, l'expression du transporteur GLAST est fortement augmentée (86%) ainsi que l'expression de la glutamine synthétase (37%) dans l'hippocampe exclusivement. Contrairement à la déficience l'expression du transporteur GLT1 n'est pas modifiée par la supplémentation. Il existe très peu de données sur l'impact du DHA sur ce métabolisme glutamatergique. Des études *in vitro* sur des cultures de cellules rénales HEK293 (Berry *et al.*, 2005) montrent la complexité du processus en mettant en évidence des effets opposés du DHA avec une inhibition de l'activité de GLAST et une stimulation de celle de GLT1. Ce que nous pouvons remarquer et que lors de la supplémentation la teneur membranaire en DHA est faiblement augmentée dans la couche CA1 mais par contre une diminution de l'AA est présente, ceci conduisant à une modification du rapport AA/DHA. On peut donc se demander si les effets observés lors

de la supplémentation ne reflètent pas cette diminution de la teneur en AA dans cette zone cérébrale. Il a pu être montré que l'AA interviendrait dans le renforcement de la neurotransmission glutamatergique. En effet, l'AA par une inhibition des récepteurs métabotropiques pré-synaptiques, permettrait une augmentation de la libération du glutamate (Breukel *et al.*, 1997) mais également en activant les récepteurs NMDA et donc en potentialisant la réponse au glutamate (Miller *et al.*, 2002). De plus l'AA inhiberait la capture du glutamate par les astrocytes *via* les transporteurs GLAST et GLT1 ceci a pu être montré par des travaux conduits *in vitro* (synaptosomes) ou *ex vivo* (tranches cérébrales) (Volterra *et al.*, 1992 , 1994 ; Lundy et McBean, 1995 ; Trotti *et al.*, 1995). Cependant le processus est plus complexe car des travaux montrent également que l'AA peut toutefois avoir un effet activateur sur GLT1, en augmentant son affinité pour le glutamate (Zerangue *et al.*, 1995). Ainsi dans notre cas, la supplémentation aurait un impact autre que la déficience sur le métabolisme glutamatergique qui reste pour le moment inexplicable dans l'état actuel des choses. On ne peut donc exclure le fait que cette perturbation soit une conséquence de l'augmentation du métabolisme mitochondrial ou alors ce sont 2 processus qui se déroulent en parallèle et que l'on ne peut relier l'un à l'autre.

Dans le cortex, on retrouve une augmentation moins marquée que dans la CA1 de l'expression de 3 gènes du métabolisme mitochondrial : Pdha1 (+22%), Sdha (+36%) et Idh3g (+25%). Contrairement à l'hippocampe, le transporteur neuronal de lactate, MCT2, a une expression augmentée de façon importante chez les animaux supplémenté (+45%). Nos données *in vitro* sur culture d'astrocytes montrent un effet rapide de l'apport en DHA sur l'expression protéique du transporteur astrocytaire, MCT1, sans modification de la production de lactate. Nous avons cependant vu précédemment que dans ces conditions l'utilisation de glucose est augmentée. Si cette utilisation glucidique n'est pas couplée à un accroissement de la production de lactate, il est possible que d'autres voies métaboliques plus en aval soient impliquées (voies de phosphorylation oxydative, de  $\beta$ -oxydation des acides gras, de cétogenèse, et de synthèse du glycogène). Lors d'une activation synaptique élevée il est suggéré que la production de corps cétoniques par les astrocytes serait un processus d'importance pour la fourniture de substrats énergétiques aux neurones. L'augmentation de l'expression protéique du transporteur MCT 1 en condition basale et en stimulation glutamatergique après une incubation à court terme avec du DHA appuie cette

hypothèse, puisque que MCT1 est également un transporteur de corps cétoniques. Et nos données *in vivo* montrent une augmentation de l'expression génique du transporteur neuronal MCT2.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

L'importance des AGPI de la série n-3 en tant que facteur nutritionnel favorable au développement et au maintien des performances cérébrales et visuelles repose tout d'abord sur la particularité du système nerveux central (cerveau, rétine) à renfermer dans ses membranes des quantités particulièrement élevées de DHA. La démonstration des propriétés neurofonctionnelles du DHA a été principalement démontrée chez l'animal (rongeurs et singe) présentant un déficit membranaire prononcé en cet AGPI, lequel est induit par une carence alimentaire en AGPI n-3 appliquée au cours de la période périnatale et chez le jeune en croissance. Sur le plan neurofonctionnel, cette carence entraîne chez l'animal des altérations cognitives et comportementales qui ont été en partie reliées à des altérations des circuits de neurotransmission dans différentes zones du cerveau, en particulier des voies dopaminergiques, sérotoninergiques et cholinergiques.

Quelques cas de déficience alimentaire en DHA ont été constatés chez l'Homme mettant notamment en évidence des retards dans le développement de l'acuité visuelle des enfants allaités (revue d'Alessandri *et al.*, 2004). Compte-tenu de l'implication des circuits monoaminergiques dans de nombreux troubles neuro-psychiatriques chez l'homme (schizophrénie, dépression, hyperactivité de l'enfant,...), il est possible qu'un déficit d'apport alimentaire en AGPI n-3 chez l'homme puisse constituer un facteur de vulnérabilité à la survenue de ces maladies (McNamara et Carlson, 2006). Or dans nos pays industrialisés, il existe un déséquilibre entre les apports en AGPI n-6 et n-3, lié principalement à un déficit en n-3, impliquant à la fois le précurseur et ses dérivés à longue chaîne (DHA) (Ailhaud *et al.*, 2006). Ce déficit est préjudiciable à l'incorporation du DHA dans les tissus cérébraux, ce qui pourrait contribuer par la même à l'émergence de ces pathologies. Cette hypothèse est également envisagée pour les maladies neurodégénératives associées au vieillissement (démence sénile, maladie d'Alzheimer). Les études épidémiologiques d'observation montrent à ce sujet une association entre des apports alimentaires élevés en AGPI n-3 à longue chaîne (principalement le DHA) et une réduction des risques pour ces maladies.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu par les AGPI n-3 sont multiples, reflétant la grande diversité des fonctions exercées par cet AGPI, allant de la modulation de la production de médiateurs actifs et des propriétés dynamiques des membranes à la

régulation de l'expression des gènes. Des données expérimentales recueillies sur un modèle animal de déficience alimentaire en AGPI n-3 nous ont permis de proposer l'hypothèse que ces acides gras pouvaient réguler le métabolisme énergétique cérébral et plus spécifiquement l'utilisation du glucose. Il est proposé que le cerveau de ces animaux présenteraient un défaut de biodisponibilité d'ATP liée à une altération de la consommation et du transport de glucose depuis la circulation à travers les cellules endothéliales de la BHE jusqu'aux neurones (Ximenes *et al.*, 2002). Notre étude de mesure de l'utilisation du FDG couplée à l'imagerie TEP confirme ces observations et démontre que le cerveau des animaux déficients en AGPI n-3 au repos est dans sa globalité en situation d'hypométabolisme glucidique qui serait liée à une moindre disponibilité du transporteur GLUT1. L'origine de cet hypométabolisme glucidique pourrait être due à une réduction de la densité et de la plasticité du transporteur endothélial et astrocytaire du glucose, les transporteurs GLUT1-45kDa et 55kDa. En effet les premiers travaux conduits ont mis en évidence une diminution spécifique de l'expression protéique de ces 2 isoformes de GLUT1 au niveau du cortex cérébral, aucune répercussion n'étant observée pour le transporteur neuronal GLUT3 (Pifferi *et al.*, 2005). Dans notre étude, cette diminution n'est pas retrouvée, vraisemblablement en raison d'une variabilité de la technique utilisée relativement importante par rapport aux variations attendues. Pour mettre en évidence de telles variations, il doit être maintenant envisagé d'utiliser des techniques plus performantes permettant la quantification des protéines : c'est le cas de la technique de spectrométrie de masse (MS/MS) couplée à une pré-séparation des protéines par électrophorèse 1 ou 2D suivie d'une digestion enzymatique (trypsine) (Lundby et Olsen, 2011).

L'utilisation de la technologie innovante des TaqMan Low Density Arrays (ou "cartes microfluidiques") a cependant permis de montrer que les animaux déficients en n-3 présentaient une altération de l'expression génique de GLUT1 et spécifiquement dans le cortex fronto-pariétal. Cette réduction persiste en situation d'activation cérébrale par exposition à un environnement enrichi, confortant l'hypothèse d'une altération consécutive du métabolisme du glucose chez les animaux déficients que ce soit au repos ou en situation d'activation. Rappelons qu'en situation d'activation neuronale, la consommation de glucose augmente généralement de 15 à 20% par rapport à la situation basale parallèlement à l'augmentation de l'expression génique de GLUT1 (Choeiri *et al.*, 2005). Pour des raisons



techniques et méthodologiques, notre expérimentation en imagerie TEP chez des animaux activés n'a pas permis de visualiser de différences entre les animaux témoins et déficients. Il serait souhaitable de réaliser des expériences complémentaires avec un test d'activation différent réalisable directement sous la caméra TEP (discrimination odorante et stimulation du bulbe olfactif par exemple chez un animal anesthésié par voie intraveineuse) (Hichami *et al.*, 2007). De plus, on a pu observer des variations interindividuelles de réponse (expression génique de GLUT1) à la stimulation chez les animaux étudiés. Pour s'affranchir de cette variabilité, il faudrait augmenter le nombre de rats par groupes et réaliser des sous-groupes en fonction de la réponse pour permettre des comparaisons à niveau de stimulation identique.

Il est proposé l'hypothèse que les AGPI n-3 et particulièrement le DHA pourraient moduler le métabolisme du glucose via la régulation de l'expression d'un élément clé de ce métabolisme, le transporteur GLUT1. La caractérisation de l'hypométabolisme cortical du glucose des animaux déficients en n-3 demanderait d'être complétée par approche métabolomique permettant la mesure des concentrations tissulaires en glucose, ATP et autres molécules impliquées dans le métabolisme énergétique (phosphocréatine par exemple). Ces approches utilisent notamment la RMN du proton et du phosphore permettant la quantification sur tissu cérébral de ces métabolites (Deng-Bryant *et al.*, 2011). Il est envisagé que le DHA exercerait un effet direct au niveau des cellules endothéliales et des astrocytes (n'excluant pas une modulation de son activité), à travers des mécanismes non encore élucidés (implication des facteurs de transcription comme les PPARs et les RXR). Notre étude *in vitro* sur astrocytes en culture primaire et celle conduite sur cellules endothéliales cérébrales (Pifferi *et al.*, 2010) montrent que l'ajout de doses physiologiques de DHA dans le milieu de culture augmente le niveau d'utilisation du glucose ainsi que l'expression protéique de GLUT1. L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes des facteurs de transcription constituera vraisemblablement une première approche pour cerner les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe, aucune modification de l'expression génique de GLUT1 n'est observée chez les animaux déficients en n-3. Cette donnée montre que le cerveau ne doit pas être considéré dans sa globalité mais bien en fonction des structures qui le composent. Au niveau de la CA1, la déficience semble surtout perturber la

neurotransmission glutamatergique. On observe des variations importantes de l'expression des transporteurs, GLT1 et GLAST, ainsi que de la glutamine synthase. Afin de conclure à une modification du métabolisme synaptique du glutamate, il faudrait compléter ces données en réalisant des quantifications de ces protéines mais également du glutamate par microdialyse intracérébrale sur animal vigile (Darvesh *et al.*, 2011). Il serait également déterminant de mesurer les concentrations tissulaires de glucose et de lactate par approche métabolomique, mais également de glycogène ainsi que l'activité des différents complexes de la phosphorylation oxydative sur explants tissulaires et/ou mitochondries isolées.

Nous avons vu que la déficience alimentaire en AGPI n-3 induit un déficit membranaire prononcé en DHA et un hypométabolisme cérébral de glucose principalement associé à une réduction de l'expression de GLUT1. En revanche, une supplémentation en DHA préformé ne module aucunement l'expression de ce transporteur au niveau cortical que l'on peut relier à l'absence de modification des teneurs membranaires de DHA. Cette supplémentation semble augmenter spécifiquement l'activité mitochondriale de synthèse d'ATP (cycle de Krebs, voie de phosphorylation oxydative) qu'il faudrait quantifier par des mesures enzymatiques sur explants hippocampiques. Une approche métabolomique comparable à celle proposée chez l'animal déficient serait indispensable pour évaluer les répercussions de la consommation d'un tel régime sur les concentrations tissulaires des métabolites énergétiques. Comme il est envisagé que cet hypermétabolisme mitochondrial entraînerait une augmentation du flux glycolytique, il serait également important de quantifier chez ces animaux l'utilisation cérébrale de glucose par la technique du  $^{18}\text{F}$ FDG couplée à l'imagerie TEP.

En conclusion, ces résultats originaux laissent ainsi entrevoir la possibilité que l'apport alimentaire en AGPI n-3 puisse intervenir sur l'énergétique et le fonctionnement cérébral dont on sait qu'ils sont altérés au cours du vieillissement et dans certains désordres neurologiques. Au cours du vieillissement, une diminution progressive du métabolisme énergétique cérébral, notamment au niveau cortical, est observée. Lors des processus neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer, l'hypométabolisme est encore plus prononcé (maximum - 20%) et est mis en évidence au niveau des cortex pariétal et temporal (Cunnane *et al.*, 2011). Dans ce dernier cas, les altérations mesurables du métabolisme du glucose, de la bioénergétique et de la fonction mitochondriale sont observées bien avant

que la maladie soit diagnostiquée et avant que le déclin cognitif s'exprime. Ces observations laissent entrevoir que ces dysfonctionnements puissent être des cibles d'action en matière de prévention. Or, l'apport alimentaire en n-3 (et notamment en DHA) pourraient constituer un facteur de protection de par les effets mis en évidence au niveau des fonctions cognitives et les corrélations établies entre leur consommation et l'incidence de la maladie d'Alzheimer (Cunnane *et al.*, 2011).

# BIBLIOGRAPHIE

Aas V, Rokling-Andersen MH, Kase ET, Thoresen GH, Rustan AC. Eicosapentaenoic acid (20:5 n-3) increases fatty acid and glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells. *J Lipid Res.* 2006 ; 47 : 366-374.

AFSSA 2006. Etude des Consommations ALimentaires de produits de la mer et Imprégnation aux éléments traces, PolluantS et Oméga 3 (CALIPSO), coordonnateur Jean-Charles Leblanc

AFSSA 2010. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras, saisine no 2006-SA-0359 du 1er Mars 2010.

Aid S, Vancassel S, Poumes-Ballihaut C, Chalon S, Guesnet P, Lavalie M. Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. *J Lipid Res.* 2003 ; 44 : 1545-1551.

Aid S, Vancassel S, Linard A, Lavalie M, Guesnet P. Dietary docosahexaenoic acid [22: 6(n-3)] as a phospholipid or a triglyceride enhances the potassium chloride-evoked release of acetylcholine in rat hippocampus. *J Nutr.* 2005 ; 135 : 1008-1013.

Ailhaud G, Guesnet P, Cunnane SC. An emerging risk factor for obesity: does disequilibrium of polyunsaturated fatty acid metabolism contribute to excessive adipose tissue development? *Br J Nutr.* 2008 ; 100 : 461-470.

Akbar M, Kim HY. Protective effects of docosahexaenoic acid in staurosporine-induced apoptosis: involvement of phosphatidylinositol-3 kinase pathway. *Journal of Neurochemistry.* 2002 ; 82 : 655-665.

Akbar M, Calderon F, Wen Z, Kim HY. Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 ; 102 : 10858-10863.

Alessandri JM, Poumes-Ballihaut C, Langelier B, Perruchot MH, Raguenez G, Lavalie M, Guesnet P. Incorporation of docosahexaenoic acid into nerve membrane phospholipids: bridging the gap between animals and cultured cells. *Am J Clin Nutr.* 2003 ; 78 : 702-710.

Alessandri JM, Guesnet P, Vancassel S, Astorg P, Denis I, Langelier B, Aid S, Poumes-Ballihaut C, Champeil-Potokar G, Lavalie M. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev.* 2004 ; 44 : 509-538.

Alessandri JM, Langelier B, Perruchot MH, Extier A, Pifferi F, Jouin M, Delpal S, Lavalie M, Guesnet P. Conversion of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) in cultured neural cells. *OCL* 2007; 14: 11-15.

Alessandri JM, Extier A, Langelier B, Perruchot MH, Heberden C, Guesnet P, Lavalie M. Estradiol favors the formation of eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and n-3 docosapentaenoic

acid (22:5n-3) from alpha-linolenic acid (18:3n-3) in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Lipids*. 2008 ; 43 : 19-28.

Alessandri JM, Extier A, Astorg P, Lavialle M, Simon N, Guesnet P. Métabolisme des acides gras oméga-3 : différences entre hommes et femmes *Nutrition Clinique et Métabolisme* 2009 ; 23 : 55-66

Alessandri JM, Extier A, Al-Gubory KH, Langelier B, Baudry C, Lepoupon C, Lavialle M, Guesnet P. Ovariectomy and 17 $\beta$ -estradiol alter transcription of lipid metabolism genes and proportions of neo-formed n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids differently in brain and liver. *J Nutr Biochem*. 2010 (sous presse doi : 10.1016/j.jnutbio.2010.07.005).

Alessandri JM, Extier A, Kaïs HA, Harbeby E , Lallemand MS, Linard A, Lavialle M, Guesnet P. Influence of gender on DHA synthesis: the response of rat liver to low dietary  $\alpha$ -linolenic acid evidences higher  $\Delta$ 4-desaturation index in females. *Eur J Nutr* 2011 (sous presse).

Alkire MT, Pomfrett CJ, Haier RJ, Gianzero MV, Chan CM, Jacobsen BP, Fallon JH. Functional brain imaging during anesthesia in humans: effects of halothane on global and regional cerebral glucose metabolism. *Anesthesiology*. 1999 ; 90 : 701-709.

Almad A, McTigue D. Chronic Expression of PPAR- $\gamma$  by oligodendrocyte lineage cells in the injured rat spinal cord. *The journal of comparative neurology*. 2010; 518: 785-799.

Arluison M, Quignon M, Nguyen P, Thorens B, Leloup C, Penicaud L. Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat*. 2004 ; 28 : 117-136.

Astorg P., Guesnet P., Alessandri JM., Galan P., Lavialle M. Acides gras polyinsaturés et santé: aperçu des connaissances actuelles. *Sciences des Aliments*. 2006 ; 26 : 8-28.

Attwell D, Iadecola C. The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci*. 2002 ; 25 : 621-625.

Barak Y, Sadovsky Y, Shalom-Barak T. PPAR Signaling in Placental Development and Function. *PPAR Research*. 2008. Article ID 142082, 11 pages.

Barcelo-Coblijn G, Hoggies E, Kitajka K, Puska LG, Zvara A, Hackler L Jr, Nyakas C, Penke Z, Farkas T. Modification by docosahexaenoic acid of age-induced alterations in gene expression and molecular composition of rat brain phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 ; 100 : 11321-11326.

Bazan NG. The onset of brain injury and neurodegeneration triggers the synthesis of docosanoid neuroprotective signaling. *Cell Mol Neurobiol*. 2006 ; 26 : 899-911.

Benistant C, Dehouck MP, Fruchart JC, Cecchelli R, Lagarde M. Fatty acid composition of brain capillary endothelial cells: effect of the coculture with astrocytes. *J Lipid Res.* 1995 ; 36 : 2311-2319.

Berger A, Mutch DM, German JB, Roberts MA. Unraveling lipid metabolism with microarrays: effects of arachidonate and docosahexaenoate acid on murine hepatic and hippocampal gene expression. *Genome Biol.* 2002 ; 3 : 1-10.

Bergemeyer HU. *Methods of enzymatic analysis* 2ème edition, 1965 ; 736-743.

Bernoud N, Fenart L, Benistant C, Pageaux JF, Dehouck MP, Molière P, Lagarde M, Cecchelli R, Lecerf J. Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells in vitro. *J Lipid Res.* 1998 ; 39 : 1816-1824.

Berry CB, Hayes D, Murphy A, Wiessner M, Rauen T, McBean GJ. Differential modulation of the glutamate transporters GLT1, GLAST and EAAC1 by docosahexaenoic acid. *Brain Res.* 2005 ; 1037 : 123-133.

Bersohn J, Spitz FJ. Linoleic and linolenic acid dependency of some brain membrane-bound enzymes after lipid deprivation in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1974 ; 57 : 293-298.

Bolanos JP, Almeida A, Moncada S. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends in Biochemical Sciences.* 2010; 35 : 145-149.

Booher J., Sensenbrenner M. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat, and human brain in flask cultures. *Neurobiology.* 1972 ; 2 : 97-105.

Bourre JM, François M, Youyou A, Dumont O, Piciotti M, Pascal G, Durand G. The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J Nutr.* 1989 ; 119 : 1880-1892.

Bourre JM, Dumont O, Clément M, Durand G. Les acides gras de la famille alpha-linolénique contrôlent la structure et la fonction du cerveau : leur nature, rôle, origine et importance alimentaire. *OCL* 1995 ; 2 : 254-63.

Boyce JA. Eicosanoid mediators of mast cells: receptors, regulation of synthesis, and pathobiologic implications. *Chem Immunol Allergy.* 2005 ; 87 : 59-79.

Braissant O, Wahli W. Differential Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor -{alpha}, -{beta}, and -{gamma} during Rat Embryonic Development. *Endocrinology.* 1998 ; 139 : 2748-2754.

Breukel AI, Besselsen E, Lopes Da Silva FH, Ghijsen WE. Arachidonic acid inhibits uptake of amino acids and potentiates PKC effects on glutamate, but not GABA, exocytosis in isolated hippocampal nerve terminals. *Brain Res.* 1997 ; 773 : 90-97.

Burdge G. Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004 ; 7 : 137-144.

Buvat I. Mise au point : Les limites du SUV. Understanding the limitations of SUV. *Médecine Nucléaire.* 2007 ; 31 : 165-172.

Calder P. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008 ; 52 : 885 – 897.

Calder PC, Yaqoob P. Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Postgrad Med.* 2009 ; 121:148-157.

Cao D, Xue R, Xu J, Liu Z. Effects of docosahexaenoic acid on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures. *J Nutr Biochem.* 2005; 16: 538-46.

Cao D, Kevala K, Kim J, Moon HS, Jun SB, Lovinger D, Kim HY. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J Neurochem.* 2009 ; 111 : 510-521.

Carrié I, Clément M, de Javel D, Francès H, Bourre JM. Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *J Lipid Res.* 2000 ; 41 : 465-472.

Chalon S. Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006 ; 75 : 259-269.

Champeil-Potokar G, Denis I, Goustard-Langelier B, Alessandri JM, Guesnet P, Lavialle M. Astrocytes in culture require docosahexaenoic acid to restore the n-3/n-6 polyunsaturated fatty acid balance in their membrane phospholipids. *J Neurosci Res.* 2004 ; 75 : 96-106.

Champeil-Potokar G, Chaumontet C, Guesnet P, Lavialle M, Denis I. . Docosahexaenoic acid (22:6n-3) enrichment of membrane phospholipids increases gap junction coupling capacity in cultured astrocytes. *Eur J Neurosci.* 2006 ; 24 : 3084-3090.

Cholet N, Seylaz J, Lacombe P, Bonvento G. Local Uncoupling of the Cerebrovascular and metabolic Responses to Somatosensory Stimulation After Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibition. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 1997 ; 17 : 1191-1201.

Choieri C, Staines W, Miki T, Seino S, Messier C. Glucose transporter plasticity during memory processing. *Neurosciences.* 2005 ; 130 : 591-600.



Clarke SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr.* 2001 ; 131 : 1129-1132.

Coti-Bertrand P, O'Kusky Jr, Innis SM. Maternal dietary (n-3) fatty acid deficiency alters neurogenesis in the embryonic rat brain. *J Nutr.* 2006 ; 136 : 1570-1575.

Cunnane SC, Anderson MJ. The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat. *J Nutr.* 1997 ; 127 : 146-152.

Cunnane SC, Francescutti V, Brenna JT, Crawford MA. Breast-fed infants achieve a higher rate of brain and whole body docosahexaenoate accumulation than formula-fed infants not consuming dietary docosahexaenoate. *Lipids.* 2000 ; 35 : 105-111.

Cunnane S, Nugent S, Roy M, Courchesne-Loyer A, Croteau E, Tremblay S, Castellano A, Pifferi F, Bocti C, Paquet N, Begdouri H, Bentourkia M, Turcotte E, Allard M, Barberger-Gateau P, Fulop T, Rapoport SI. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition.* 2011 ; 27 : 3-20.

Cunningham P, McDermott L. Long chain PUFA transport in human term placenta. *J Nutr.* 2009 ; 139 : 636-639.

Darvesh AS, Carroll RT, Geldenhuys WJ, Gudelsky GA, Klein J, Meshul CK, Van der Schyf CJ. In vivo brain microdialysis: advances in neuropsychopharmacology and drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2011 ; 6 : 109-127.

Delion S, Chalon S, Herault J, Guilloteau D, Besnard JC, Durand G. Chronic dietary alpha-linolenic acid deficiency alters dopaminergic and serotonergic neurotransmission in rats. *J Nutr.* 1994 ; 124 : 2466-2476.

Delion S, Chalon S, Guilloteau D, Besnard JC, Durand G. alpha-Linolenic acid dietary deficiency alters age-related changes of dopaminergic and serotonergic neurotransmission in the rat frontal cortex. *J Neurochem.* 1996; 66 : 1582-1591.

Delion S, Chalon S, Guilloteau D, Lejeune B, Besnard JC, Durand G. Age-related changes in phospholipid fatty acid composition and monoaminergic neurotransmission in the hippocampus of rats fed a balanced or an n-3 polyunsaturated fatty acid deficient diet. *J. Lipid Res.* 1997 ; 38 : 680-689.

Delton-Vandenbroucke I, Grammas P, Anderson RE. Polyunsaturated fatty acid metabolism in retinal and cerebral microvascular endothelial cells. *J Lipid Res.* 1997 ; 38 : 147-159.

DeMar JC Jr, Ma K, Bell JM, Rapoport SI. Half-lives of docosahexaenoic acid in rat brain phospholipids are prolonged by 15 weeks of nutritional deprivation of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Neurochem.* 2004 ; 91 : 1125-1137.

Deng-Bryant Y, Prins M, Hovda D, Harris N. Ketogenic Diet Prevents Alterations in Brain Metabolism in Young but not Adult Rats after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2011 (sous presse).

Diab A, Deng C, Smith JD, Hussain RZ, Phanavanh B, Lovett-Racke AE, Drew PD, Racke MK. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Agonist 15-Deoxy-12,14-Prostaglandin J2 Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. 2002 ; 168 : 2508-2515.

DiNuzzo M, Maraviglia B, Giove F. Why does the brain (not) have glycogen? *Bioessays*. 2011 ; 33 : 319-26.

Drevets WC. Functional anatomical abnormalities in limbic and prefrontal cortical structures in major depression. *Prog Brain Res*. 2000 ; 126 : 413-431.

Duelli R, Kuschinsky W. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News Physiol Sci*. 2001 ; 16 : 71-76.

Duttaroy AK. Transport of fatty acids across the human placenta: a review. *Prog Lipid Res*. 2009 ; 48 : 52-61.

El Messari S, Leloup C, Quignon M, Brisorgueil MJ, Pénicaud L, Arluison M. Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (Glut4) in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 1998 ; 399 : 492-512.

Evans R, Barish G, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nature Medecine*. 2004 ; 10 : 1-7.

Extier A, Perruchot MH, Baudry C, Guesnet P, Lavialle M, Alessandri JM. Differential effects of steroids on the synthesis of polyunsaturated fatty acids by human neuroblastoma cells. *Neurochem Int*. 2009 ; 55 : 295-301.

Extier A, Langelier B, Perruchot MH, Guesnet P, Van Veldhoven PP, Lavialle M, Alessandri JM. Gender affects liver desaturase expression in a rat model of n-3 fatty acid repletion. *J Nutr Biochem*. 2010 ; 21 : 180-187.

Farquharson J, Cockburn F, Patrick WA, Jamieson EC, Logan RW. Infant cerebral cortex phospholipid fatty-acid composition and diet. *Lancet*. 1992 ; 340 : 810-813.

Farquharson J, Jamieson EC, Abbasi KA, Patrick WJ, Logan RW, Cockburn F. Effect of diet on the fatty acid composition of the major phospholipids of infant cerebral cortex. *Arch Dis Child*. 1995; 72: 198-203.

Favrelière S, Barrier L, Durand G, Chalon S, Tallineau C. Chronic Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Deficiency Affects the Fatty Acid Composition of Plasmamylethanolamine and

Phosphatidylethanolamine Differently in Rat Frontal Cortex, Striatum, and Cerebellum. *Lipids*. 1998 ; 33 : 401-407.

Fedorova I, Salem N Jr. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006 ; 75 : 271-289.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957 ; 226 : 497-509.

Freeman MP. Omega-3 fatty acids in psychiatry: a review. *Ann Clin Psychiatry*. 2000 ; 12 : 159-165.

Galli C, Agradi E, Paoletti R. The (n-6)pentaene:(n-3)hexane fatty acid ratio as an index of linolenic acid deficiency. *Biochim Biophys Acta*. 1974 ; 369 : 142-145.

Gao F, Kim HW, Igarashi M, Kiesewetter D, Chang L, Ma K, Rapoport SI., *Biochim Biophys Acta*. 2011 ; 1811 : 484-489.

Gerbi A, Zerouga M, Debray M Durand G, Chanez C, Bourre JM. Effect of fish oil diet on fatty acid composition of phospholipids of brain membranes and on kinetic properties of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase isoenzymes of weaned and adult rats. *J Neurochem*. 1994 ; 62 : 1560-1569.

Gerhart DZ, Leino RL, Borson ND, Taylor WE, Gronlund KM, McCall AL, Drewes LR. Localization of glucose transporter GLUT 3 in brain: comparison of rodent and dog using species-specific carboxyl-terminal antisera. *Neuroscience*. 1995 ; 66 : 237-246.

Goustard-Langelier B, Alessandri JM, Raguenez G, Durand G, Courtois Y. Phospholipid incorporation and metabolic conversion of n-3 polyunsaturated fatty acids in the Y79 retinoblastoma cell line. *J Neurosci Res*. 2000 ; 60 : 678-685.

Gregory M, See V, Gibson R, Schuller K. Cloning and functional characterisation of a fatty acyl elongase from southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2010 ; Part B 155 : 178-185.

Greiner RS, Moriguchi T, Hutton A, Slotnick BM, Salem N Jr. Rats with low levels of brain docosahexaenoic acid show impaired performance in olfactory-based and spatial learning tasks. *Lipids*. 1999; 34 :239-43.

Grintal B, Champeil-Potokar G, Lavialle M, Vancassel S, Breton S, Denis I. Inhibition of astroglial glutamate transport by polyunsaturated fatty acids: evidence for a signalling role of docosahexaenoic acid. *Neurochem Int*. 2009 ; 54 : 535-543.

Guesnet P, Pascal G, Durand G. Effects of dietary alpha-linolenic acid deficiency during pregnancy and lactation on lipid fatty acid composition of liver and serum in the rat. *Reprod Nutr Dev*. 1988 ; 28 : 275-292.

Guesnet P, Alasnier C, Alessandri JM, Durand G. Modifying the n-3 fatty acid content of the maternal diet to determine the requirements of the fetal and suckling rat. *Lipids*. 1997;32:527-34.

Guesnet P, Alessandri JM, Astorg P, Pifferi F, Lavialle M. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *OCL*. 2005 ; 12 : 333-343.

Guesnet P, Alessandri JM. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. *Biochimie*. 2011 ; 93 : 7-12. Epub 2010 May 15.

Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med*. 2007 ; 13 : 54-63.

Halassa MM, Haydon PG. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol*. 2010 ; 72 : 335-355.

Hall MG, Quignodon L, Desvergne B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\beta/\delta$  in the Brain: Facts and Hypothesis. *PPAR research*. Volume 2008, Article ID 780452, 10 pages.

Hamilton L, Greiner R, Salem N Jr, Kim HY. n-3 fatty acid deficiency decreases phosphatidylserine accumulation selectively in neuronal tissues. *Lipids*. 2000 ; 35 : 863-869.

Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, Thorlin T, Nilsson M, Rönnebäck L. Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem Int*. 2000 ; 37: 317-329.

Harder DR, Alkayed NJ, Lange NJ, Gedbrems D, Roman RJ. Functional hyperemia in the brain: hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites. *Stroke*. 1998 ; 29 : 229–234.

He C, Qu X, Cui L, Wang J, Kang JX. Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritegenesis by docosahexaenoic acid. *PNAS*. 2009 ; 106 : 11370-11375.

He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *PNAS*. 2003 ; 26 : 15712–15717.

Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci*. 2004 ; 27 : 735-743.

Hichami A, Datiche F, Ullah S, Liénard F, Chardigny JM, Cattarelli M, Akhtar Khan N. Olfactory discrimination ability and brain expression of c-fos, Girs and Glut1 mRNA are altered in n – 3 fatty acid-depleted rats. *Behavioural Brain Research*. 2007 ; 184 : 1-10.

Högyes E, Nyakas C, Kiliaan A, Farkas T, Penke B, Luiten PG. Neuroprotective effect of developmental docosahexaenoic acid supplement against excitotoxic brain damage in infant rats. *Neuroscience*. 2003;119:999-1012.

Holman RT, Johnson SB, Hatch TF. A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am J Clin Nutr*. 1982 ; 35 : 617-623.

Iadecola C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci*. 1993 ; 16 : 206-214.

Innis SM, Dier RA. Brain astrocyte synthesis of docosahexaenoic acid from n-3 fatty acids is limited at the elongation of docosapentaenoic acid. *J Lipid Res*. 2002 ; 43 : 1529-1536.

Innis SM, Friesen RW. Essential n-3 fatty acids in pregnant women and early visual acuity maturation in term infants. *Am J Clin Nutr*. 2008 ; 87 : 548-557.

Igarashi M, DeMar JC Jr, Ma K, Chang L, Bell JM, Rapoport SI. Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid by rat brain is unaffected by dietary n-3 PUFA deprivation. *J Lipid Res*. 2007a ; 48 : 1150-1158.

Igarashi M, Ma K, Chang L, Bell JM, Rapoport SI. Dietary n-3 PUFA deprivation for 15 weeks upregulates elongase and desaturase expression in rat liver but not brain. *J Lipid Res*. 2007b ; 48 : 2463-2470.

Jensen CL, Chen H, Fraley JK, Anderson RE, Heird WC. Biochemical effects of dietary linoleic/alpha-linolenic acid ratio in term infants. *Lipids*. 1996 ;31 :107-13.

Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Christian B, Demeure O. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J Nutr*. 2005 ; 135 : 2503-2506.

Kaduce TL, Chen Y, Hell JW, Spector AA. Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 fatty acid precursors in rat hippocampal neurons. *J Neurochem*. 2008 ; 105 : 1525-1535.

Katakura M, Hashimoto M, Shahdat HM, Gamoh S, Okui T, Matsuzaki K, Shido O. Docosahexaenoic acid promotes neuronal differentiation by regulating basic helix-loop-helix transcription factors and cell cycle in neural stem cells. *Neuroscience*. 2009 ; 160 : 651-660.

Kawakita E, Hashimoto M, Shido O. Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. *Neuroscience*. 2006 ; 139 : 991-997.

Kearns SD, Haag M. The effect of omega-3 fatty acids on Ca-ATPase in rat cerebral cortex. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002 ; 67 : 303-308.

Kim HY, Akbar M, Lau A, Edsall L. Inhibition of Neuronal Apoptosis by Docosahexaenoic Acid (22:6n-3) Role of phosphatidylserine in apoptotic effect. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275 : 35215–35223.

Kim HY, Akbar M, Lau A. Effects of docosapentaenoic acid on neuronal apoptosis. *Lipids*. 2003 ; 38 : 453-457.

Kim HY, Akbar M, Kim YS. Phosphatidylserine-dependent neuroprotective signaling promoted by docosahexaenoic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2010 ; 82 : 165-172.

Kitajka K, Puskas LG, Zvara A, Hackler L Jr, Barcelo-Coblijn G, Yeo YK, Farkas T. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 ; 99 : 2619-2624.

Kitajka K, Sinclair A, Weisinger R, Weisinger H, Mathai M, Jayasooriya A, Halver J, Puskas L. Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. *PNAS*. 2004 ; 101 : 10931–10936.

Kodas E, Vancassel S, Lejeune B, Guilloteau D, Chalon S. Reversibility of n-3 fatty acid deficiency-induced changes in dopaminergic neurotransmission in rats: critical role of developmental stage. *Journal of Lipid Research*. 2002 ; 43 : 1209-1219.

Kodas E, Galineau L, Bodard S, Vancassel S, Guilloteau D, Besnard JC, Chalon S. Serotonergic neurotransmission is affected by n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat. *J Neurochem*. 2004; 89 : 695-702.

Kothapalli K, Anthony J, Pan B, Hsieh A, Nathanielsz P, Brenna T. Differential Cerebral Cortex Transcriptomes of Baboon Neonates Consuming Moderate and High Docosahexaenoic Acid Formulas. *PLoS One*. 2007 ; 2 : e370.

Kummer MP, Heneka MT. PPARs in Alzheimer's Disease. *PPAR research*. 2008 ; Volume 2008, Article ID 403896, 8 pages.

Kuschinsky W. Neuronal-vascular coupling. A unifying hypothesis. *Adv Exp Med Biol*. 1997 ; 413 : 167-176.

Lafourcade M, Larrieu T, Mato S, Duffaud A, Sepers M, Matias I, De Smedt-Peyrusse V, Labrousse V, Bretillon L, Matute C, Rodriguez-Puertas R, Layé S, Manzoni O. Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nature Neuroscience*. 2011 ; 14 : 345-350.

Langelier B, Alessandri JM, Perruchot MH, Guesnet P, Lavialle M. Changes of the transcriptional and fatty acid profiles in response to n-3 fatty acids in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Lipids*. 2005 ; 40 : 719-728.

Langelier B, Linard A, Bordat C, Lavalie M, Heberden C. Long Chain-Polyunsaturated Fatty Acids Modulate Membrane Phospholipid Composition and Protein Localization in Lipid Rafts of Neural Stem Cell Cultures. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2010 ; 110 : 1356–1364.

Lattka E, Illig T, Koletzko B, Heinrich J. Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster as related to essential fatty acid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2010 ; 21 : 64-69.

Lauritzen I, Blondeau N, Heurteaux C, Widmann C, Romey G, Lazdunski M. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J*. 2000 ; 19: 1784-93.

Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH, Michaelsen KF. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res*. 2001 ; 40 : 1-94.

Lavalie M, Champeil-Potokar G, Alessandri JM, Balasse L, Guesnet P, Papillon C, Pévet P, Vancassel S, Vivien-Roels B, Denis I. An (n-3) polyunsaturated fatty acid-deficient diet disturbs daily locomotor activity, melatonin rhythm, and striatal dopamine in Syrian hamsters. *J Nutr*. 2008 ; 138 : 1719-1724.

Lavalie M, Denis I, Guesnet P, Vancassel S. Involvement of omega-3 fatty acids in emotional responses and hyperactive symptoms. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2010 ; 21 : 899–905.

Layé S. Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2010 ; 82 : 295–303.

Leloup C, Arluison M, Leptit N, Cartier N, Marfaing-Jallat P, Ferre P, Pénicaud L. Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Res*. 1994 ; 638 : 221-226.

Lim SY, Hoshiba J, Moriguchi T, Salem N Jr. N-3 fatty acid deficiency induced by a modified artificial rearing method leads to poorer performance in spatial learning tasks. *Pediatr Res*. 2005; 58: 741-8.

Lingrel JB, Williams MT, Vorhees CV, Moseley AE. Na,K-ATPase and the role of alpha isoforms in behavior. *J Bioenerg Biomembr*. 2007 ; 39 : 385-389.

Loaiza A, Porras OH, Barros LF. Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J Neurosci*. 2003 ; 23 : 7337-7342.

Lou HC, Edvinsson L, MacKenzie ET. The concept of coupling blood flow to brain function: revision required? *Ann Neurol*. 1987 ; 22 : 289-297.

Lundby A, Olsen JV. GeLCMS for In-Depth Protein Characterization and Advanced Analysis of Proteomes. *Methods Mol Biol*. 2011 ; 753 : 143-155.

Lundy DF, McBean GJ. Pre-incubation of synaptosomes with arachidonic acid potentiates inhibition of [3H]D-Aspartate transport. *Eur J Pharmacol.* 1995 ; 291 : 273-279.

Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, Serhan CN, Bazan NG. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2005 ; 115 : 2774-2783.

Magistretti P. Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2009 ; 90 : 875S-880S.

Marcheselli V, Hong S, Lukiw W, Hua Tian X, Gronert K, Musto A, Hardy M, Gimenez J, Chiang N, Serhan C, Bazan N. Novel Docosanoids Inhibit Brain Ischemia-Reperfusion-mediated

Leukocyte Infiltration and Pro-inflammatory Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003 ; 278 : 43807–43817.

Martin RE, Rodriguez de Turco EB, Bazan NG. Development maturation of hepatic n-3 polyunsaturated fatty acid metabolism : supply of docosahexaenoic acid to retina and brain. *J. nutr. biochem.* 1994 ; 5 : 151-160.

Massiera F, Barbry P, Guesnet P, Joly A, Luquet S, Moreilhon-Brest C, Mohsen-Kanson T, Amri EZ, Ailhaud G. A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. *J. Lipid Res.* 2010 ; 51: 2352–2361.

Matsugami TR, Tanemura K, Mieda M, Nakatomi R, Yamada K, Kondo T, Ogawa M, Obata K, Watanabe M, Hashikawa T, Tanaka K. From the Cover : Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 ; 103 : 12161-12166.

Matsumura A, Mizokawa S, Tanaka M, Wada Y, Nozaki S, Nakamura F, Shiomi S, Ochi H, Watanabe Y. Assessment of microPET performance in analyzing the rat brain under different types of anesthesia: comparison between quantitative data obtained with microPET and ex vivo autoradiography. *NeuroImage.* 2003 ; 20 : 2040–2050.

McCall AL, Van Bueren AM, Moholt-Siebert M, Cherry NJ, Woodward WR. Immunohistochemical localization of the neuron-specific glucose transporter (GLUT3) to neuropil in adult rat brain. *Brain Res.* 1994 ; 659 : 292-297.

McKenna MC, Stevenson JH, Huang X, Hopkins IB. Differential distribution of the enzymes glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in cortical synaptic mitochondria contributes to metabolic compartmentation in cortical synaptic terminals. *Neurochem Int.* 2000 ; 37 : 229-241.

McNamara RK et Carlson SE. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006 ; 75 : 329-349.



Mingam R, Moranis A, Bluth RM, De Smedt-Peyrusse V, Kelley K, Guesnet P, Lavalie M, Dantzer R, Layé S. Uncoupling of interleukin-6 from its signalling pathway by dietary n-3-polyunsaturated fatty acid deprivation alters sickness behaviour in mice. *European Journal of Neuroscience*. 2008 ; 28 : 1877–1886.

Mitchell DC, Niu SL, Litman BJ. DHA-rich phospholipids optimize G-Protein-coupled signaling. *J Pediatr*. 2003 ; 143 : S80-86.

Momosaki S, Hatano K, Kawa Sum Y, Shi Kato T, Ho Soi R, Kobayashi K, Inoue O, Ito K. Rat-PET Study Without Anesthesia: Anesthetics Modify the Dopamine D1 Receptor Binding in Rat Brain. *Synapse*. 2004 ; 54 : 207–213.

Moore SA, Yoder E, Spector AA. Role of the blood-brain barrier in the formation of long-chain omega-3 and omega-6 fatty acids from essential fatty acid precursors. *J Neurochem*. 1990;55:391-402.

Moore SA. Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro. *J Mol Neurosci*. 2001 ; 16 : 195-200.

Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Ceru MP. Immunolocalization of Peroxisome proliferator activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*. 2004 ; 123 : 131–145.

Moriguchi T et Salem N Jr. Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance. *J Neurochem*. 2003 ; 87 : 297-309.

Morrison WR, Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride—methanol. *J Lipid Res*. 1964 ; 5 : 600-608.

Nagamatsu S, Sawa H, Kamada K, Nakamichi Y, Yoshimoto K, Hoshino T. Neuron-specific glucose transporter (NSGT): CNS distribution of GLUT3 rat glucose transporter (RGT3) in rat central neurons. *FEBS Lett*. 1993 ; 334 : 289-295.

Nehlig A, Coles JA. Cellular pathways of energy metabolism in the brain: is glucose used by neurons or astrocytes? *Glia*. 2007;55:1238-1250.

Niot I, Poirier H, Tran TT, Besnard P. Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog Lipid Res*. 2009 ; 48 : 101-115.

Novak E, Dyer R, Innis S. High dietary  $\omega$ -6 fatty acids contribute to reduced docosahexaenoic acid in the developing brain and inhibit secondary neurite growth. *Brain Res*. 2008 ; 1237 : 136-145.

O'Brien J, Klu KM, Hopkin IB, Malecki EA, McKenna MC. Kinetic Parameters and Lactate Dehydrogenase isoenzyme activities support possible lactate utilization by neurons. *Neurochem Res.* 2007 ; 32 : 957-607.

Olstad E, Qu H, Sonnewald U. Glutamate is preferred over glutamine for intermediary metabolism in cultured cerebellar neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 ; 27 : 811-820.

Ori C, Dam M, Pizzolato G, Battistin L, Giron G. Effects of isoflurane anesthesia on local cerebral glucose utilization in the rat. *Anesthesiology.* 1986 ; 65 : 152-156.

Oz G, Seaquist ER, Kumar A, Criego AB. Human brain glycogen content and metabolism: implications on its role in brain energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 ; 292 : E946–951.

Pellerin L., Magistretti P. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *PNAS.* 1994 ; 91 : 10625-10629.

Pellerin L., Magistretti P. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *The Neuroscientist.* 2004 ; 10 : 53-62.

Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia.* 2007; 55: 1251-62.

Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol.* 2000 ;20: 5119-28.

Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem.* 2005 ; 94 : 1-14.

Pietsh A, Lorenz R. Rapid separation of the major phospholipid classes on a single aminopropoyl cartridge. *Lipids.*1993 ; 28 : 945-947.

Pifferi F, Roux F, Langelier B, Alessandri JM, Vancassel S, Jouin M, Laviaille M, Guesnet P. (n-3) Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency Reduces the Expression of Both Isoforms of the Brain Glucose Transporter GLUT1 in Rats. *The Journal of Nutrition.* 2005; 135 : 2241-2246.

Pifferi F., Jouin M., Alessandri JM., Haedke U., Roux F., Perrière N., Denis I., Laviaille M., Guesnet P. N-3 fatty acids modulate brain glucose transport in endothelial cells of the blood brain barrier. *Prostaglandins, Leukotrienes and essential fatty acids.* 2007 ; 77 : 279-286.

Pifferi F, Jouin M, Alessandri JM, Roux F, Perrière N, Langelier B, Laviaille M, Cunnane S, Guesnet P. n-3 long-chain fatty acids and regulation of glucose transport in two models of rat brain endothelial cells. *Neurochem Int.* 2010 ; 56:703-710.

Plourde M, Cunnane SC. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007 ; 32 : 619-634.

Polak P, Kalinin S, Dello Russo C, Gavriluk V, Sharp A, Peters J, Richardson J, Willson T, Weinberg G, Feinstein D. Protective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ / $\gamma$  agonist in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*. 2005; 168 : 65 – 75.

Poumes-Ballihaut C, Langelier B, Houlier F, Alessandri JM, Durand G, Latge C, Guesnet P. Comparative bioavailability of dietary alpha-linolenic and docosahexaenoic acids in the growing rat. *Lipids*. 2001 ; 36 : 793-800.

Poumes-Ballihaut C. Effets d'un apport alimentaire en acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3) sur la composition lipidique membranaire du cerveau et de la rétine, et sur deux fonctions neurophysiologiques chez le rat : la neurotransmission dopaminergique corticale et la réponse électrique de la rétine. Thèse de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, 2002.

Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang YP, Lockhart DJ, Schultz PG, Tsien JZ, Hu Y. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 ; 97 : 12880-12884.

Rao JS, Ertley RN, Lee HJ, DeMar JC Jr, Arnold JT, Rapoport SI, Bazinet RP. n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. *Mol Psychiatry*. 2007a ; 12 : 36-46.

Rao JS, Ertley RN, DeMar JC Jr, Rapoport SI, Bazinet RP, Lee HJ. Dietary n-3 PUFA deprivation alters expression of enzymes of the arachidonic and docosahexaenoic acid cascades in rat frontal cortex. *Mol Psychiatry*. 2007b ; 12 : 151-157.

Rapoport SI, Rao JS, Igarashi M. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2007; 77 : 251–261.

Rapoport SI, Igarashi M, Gao F. Quantitative contributions of diet and liver synthesis to docosahexaenoic acid homeostasis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2010 ; 82 : 273-276.

Reddy JK et Hashimoto T. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ : An adaptive metabolic system. *Annu. Rev. Nutr*. 2001 ; 21 : 193–230.

Rosa-Neto P et Leuzy A. Imagerie moléculaire en TEP dans la maladie d'Alzheimer. *La revue canadienne de la maladie d'Alzheimer et autres démences*. Pages 18-24.

Saad LO, Mirandola S, Maciel EN, Castillo RF. Lactate Dehydrogenase Activity is inhibited by methylmalonate in vitro, *Neurochem Res.* 2006 ; 31 : 541-548.

Salem N Jr, Litman B, Kim HY, Gawrisch K. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids.* 2001 ; 36 : 945-959.

Schlag BD, Vondrasek JR, Munir M, Kalandadze A, Zeleniaia OA, Rothstein JD, Robinson MB. Regulation of the glial Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Mol Pharmacol.* 1998 ; 53 : 355-369.

Scott BL, Bazan NG. Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 ; 86 : 2903-2907.

Segovia G, Del Arco A, De Blas M, Garrido P, Mora F. Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. *Behavioural Brain Research.* 2008 ; 187 : 304–311.

Serhan CN, Arita M, Hong S, Gotlinger K. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids.* 2004 ; 39 : 1125-1132.

Seyfried TN, Mukherjee P. Targeting energy metabolism in brain cancer: review and hypothesis. *Nutr Metab (Lond).* 2005 ; 2 : 30.

Shaikh SR, Cherezov V, Caffrey M, Stillwell W, Wassall SR. Interaction of cholesterol with a docosahexaenoic acid-containing phosphatidylethanolamine: trigger for microdomain/raft formation? *Biochemistry.* 2003 ; 42 : 12028-12037.

Sibson NR, Dhankhar A, Mason GF, Rothman DL, Behar KL, Shulman RG. Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 ; 95: 316-321.

Sickmann HM, Walls AB, Schousboe A, Bouman SD. Functional significance of brain glycogen in sustaining glutamatergic neurotransmission. *J Neurochem.* 2009 ; 109 : 80-86.

Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* 2002 ; 56 : 365-379.

Simopoulos AP. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio: health implications. *OCL* 2010; 17 : 267-75.

Soderhjelm L., Wiese HF, Holman RT. The role of polyunsaturated fatty acids in human nutrition and metabolism. *Prog. Chem. Fats Lipids* 1970; IX :555-85.

Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Ptlak CS, Petigrew KD, Sakurada O, Shinohara M. The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem.* 1977 ; 28 : 897-916.

Sublette ME, Milak MS, Hibbeln JR, Freed PJ, Oquendo MA, Malone KM, Parsey RV, Mann JJ. Plasma polyunsaturated fatty acids and regional cerebral glucose metabolism in major depression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009 ; 80 : 57-64.

Suominen-Taipale AL, Partonen T, Turunen AW, Männistö S, Jula A, Verkasalo PK. Fish consumption and omega-3 polyunsaturated fatty acids in relation to depressive episodes: a cross-sectional analysis. *PLoS One.* 2010 ; 5 : e10530.

Swanson AR, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, Longuemare MC. Neural regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci.* 1997 ; 17 : 932-940.

Tam O, Innis SM. Dietary polyunsaturated fatty acids in gestation alter fetal cortical phospholipids, fatty acids and phosphatidylserine synthesis. *Dev Neurosci.* 2006 ; 28 : 222-229.

Tanaka K, Watase K, Matabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Hori S, Takimoto M, Wada K. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT1. *Science.* 1997 ; 276 : 1699-1702.

Thorens B. GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection. *Mol Membr Biol.* 2001 ; 18 : 265-273.

Trotti D, Volterra A, Lehre KP, Rossi D, Gjesdal O, Racagni G, Danbolt NC. Arachidonic acid inhibits a purified and reconstituted glutamate transporter directly from the water phase and not via the phospholipid membrane. *J Biol Chem.* 1995 ; 270 : 9890-9895.

Tsukada H, Kakiuchi T, Fukumoto D, Nishiyama S, Koga K. Docosahexaenoic acid (DHA) improves the age-related impairment of the coupling mechanism between neuronal activation and functional cerebral blood flow response: a PET study in conscious monkeys. *Brain Res.* 2000 ; 862 : 180-186.

Uauy RD, Birch DG, Birch EE, Tyson JE, Hoffman DR. Effect of dietary omega-3 fatty acids on retinal function of very-low-birth-weight neonates. *Pediatr Res.* 1990 ; 28 : 485-492.

Umezawa M, Ohta A, Tojo H, Yagi H, Hosokawa M, Takeda T. Dietary alpha-linolenate/linoleate balance influences learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Brain Res.* 1995 ; 669 : 225-233.

- Vancassel S, Aïd S, Pifferi F, Morice E, Nosten-Bertrand M, Chalon S, Laviaille M. Cerebral asymmetry and behavioral lateralization in rats chronically lacking n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biol Psychiatry*. 2005 ; 58 : 805-811.
- Vannucci SJ. Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain. *J Neurochem*. 1994 ; 62 : 240-246.
- Vannucci SJ, Koehler-Stec EM, Li K, Reynolds TH, Clark R, Simpson IA. GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. *Brain Res*. 1998a ; 797 : 1-11.
- Vannucci SJ, Reinhart R, Maher F, Bondy CA, Lee WH, Vannucci RC, Simpson IA. Alterations in GLUT1 and GLUT3 glucose transporter gene expression following unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 1998b ; 107 : 255-264.
- Vannucci SJ, Simpson IA. Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 ; 285 : E1127-1134.
- Vannucci RC, Vannucci SJ. Glucose metabolism in the developing brain. *Semin Perinatol*. 2000 ; 24 : 107-115.
- Villringer A, Dirnagl U. Coupling of brain activity and cerebral blood flow: basis of functional neuroimaging. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1995 ; 7 : 240-276.
- Volterra A, Trotti D, Cassutti C, Tromba C, Galimberti R, Lecchoi P, Racagui G. A role for the arachidonic acid cascade in fast synaptic modulation: ion channels and transmitter uptake systems as target proteins. *Adv Exp Med Biol*. 1992 ; 318 : 147-158.
- Wahl M, Schilling L. Regulation of cerebral blood flow--a brief review. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*. 1993 ; 59 : 3-10.
- Wainwright PE, Huang YS, Coscina DV, Lévesque S, McCutcheon D. Brain and behavioral effects of dietary n-3 deficiency in mice: a three generational study. *Dev Psychobiol*. 1994 ; 27 : 467-487.
- Wang X, Zhao X, Mao ZY, Wang XM, Liu ZL. Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid on glutamate-induced cytotoxicity in rat hippocampal cultures. *Neuroreport*. 2003; 14:2457-61.
- Wassall SR, Brzustowicz MR, Shaikh SR, Cherezov V, Caffrey M, Stillwell W. Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids. The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation. *Chem Phys Lipids*. 2004 ; 132 : 79-88.
- Wheeler TG, Benolken RM, Anderson RE. Visual membranes: specificity of fatty acid precursors for the electrical response to illumination. *Science*. 1975 ; 188 : 1312-1314.

Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr.* 2003 ; 89 : 3-9.

Wood J, Williams J, Pandarinathan L, Janero D, Lammi-Keefe C, Makriyannis A. Dietary docosahexaenoic acid supplementation alters select physiological endocannabinoid-system metabolites in brain and plasma. *Journal of Lipid Research.* 2010 ; 51 : 1416-1423.

Ximenes Da Silva A, Lavielle F, Gendrot G, Guesnet P, Alessandri JM, Lavielle M. Glucose transport and utilization are altered in the brain of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Neurochem.* 2002 ; 81 : 1328-1337.

Yu AC, Schousboe A, Hertz L. Metabolic fate of 14C-labeled glutamate in astrocytes in primary cultures. *J Neurochem.* 1982 ; 39 : 954-960.

Yu N., Martin JL., Stella N., Magistretti P. Arachidonic acid stimulates glucose uptake in cerebral cortical astrocytes. *PNAS.* 1993 ; 90 : 4042-4046

Zelenaia O, Schlag BD, Gochenauer GE, Ganel R, Song W, Beesley JS, Grinspan JB, Rothstein JD, Robinson MB. Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF-kappaB. *Mol Pharmacol.* 2000 ; 57 : 667-678.

Zerangue N, Arriza JL, Amara SG, Kavanaugh MP. Differential modulation of human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid. *J Biol Chem.* 1995 ; 270 : 6433-6435.

Zhao FQ, Keating AF. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics.* 2007 ; 8 : 113-128.

Zimmer L, Delpal S, Guilloteau D, Aïoun J, Durand G, Chalon S. Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency alters dopamine vesicle density in the rat frontal cortex. *Neurosci Lett.* 2000 ; 284 : 25-28.

# ANNEXES





Acides Gras	PC			GPE			PS		
	Equilibré	Déficient	Supplémenté	Equilibré	Déficient	Supplémenté	Equilibré	Déficient	Supplémenté
14:0	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,0 ± 0,0	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,3 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
16:0	29,7 ± 0,6	30,3 ± 1,7	28,3 ± 0,9	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,06
18:0	6,4 ± 0,4	6,4 ± 0,3	6,5 ± 0,3	6,0 ± 0,5	6,7 ± 0,2	6,3 ± 0,2	7,2 ± 0,4	7,3 ± 0,6	7,4 ± 0,4
<b>Σ Saturés</b>	<b>36,7 ± 1,0</b>	<b>37,2 ± 1,9</b>	<b>35,3 ± 0,7</b>	<b>8,4 ± 0,5</b>	<b>9,2 ± 0,2</b>	<b>8,6 ± 0,2</b>	<b>8,3 ± 0,5</b>	<b>8,3 ± 0,6</b>	<b>8,4 ± 0,4</b>
16:1 n-9	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,05	0,2 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,1 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,01 ± 0,01
16:1 n-7	0,3 ± 0,04	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,04	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,02	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,02
18:1 n-9	10,9 ± 0,6	10,5 ± 0,3	10,5 ± 0,6	3,0 ± 0,5	3,0 ± 0,4	3,3 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,4	2,8 ± 0,2
18:1 n-7	3,1 ± 0,3	3,2 ± 0,2	2,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,06	0,4 ± 0,05
20:1 n-9	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,04	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,02
<b>Σ Monoinsaturés</b>	<b>15,1 ± 0,1</b>	<b>14,8 ± 0,5</b>	<b>14,3 ± 0,9</b>	<b>4,0 ± 0,6</b>	<b>4,0 ± 0,6</b>	<b>4,4 ± 0,3</b>	<b>3,5 ± 0,3</b>	<b>3,4 ± 0,5</b>	<b>3,7 ± 0,3</b>
18:2 n-6	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,04	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,01
20:3 n-6	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,15 ± 0,05	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,02
20:4 n-6	3,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	4,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>b</sup>
22:4 n-6	0,4 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,04	0,3 ± 0,1
22:5 n-6	0,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,2 ± 0,04 <sup>a</sup>	5,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,2 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,03 <sup>a</sup>
<b>Σ AGPI n-6</b>	<b>4,2 ± 0,2<sup>a</sup></b>	<b>5,6 ± 0,2<sup>b</sup></b>	<b>3,3 ± 0,2<sup>c</sup></b>	<b>6,2 ± 0,2<sup>a</sup></b>	<b>10,9 ± 0,5<sup>b</sup></b>	<b>4,7 ± 0,3<sup>c</sup></b>	<b>2,0 ± 0,1<sup>a</sup></b>	<b>5,5 ± 0,5<sup>b</sup></b>	<b>1,8 ± 0,1<sup>a</sup></b>
20:5 n-3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,02 ± 0,02	0,0 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0,1 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,01
22:5 n-3	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,1 ± 0,03	0,02 ± 0,0	0,1 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,01
22:6 n-3	2,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,6 ± 1,3 <sup>a</sup>	2,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	8,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	4,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	5,0 ± 0,3 <sup>a</sup>
<b>Σ AGPI n-3</b>	<b>2,6 ± 0,4<sup>a</sup></b>	<b>0,8 ± 0,1<sup>b</sup></b>	<b>2,5 ± 0,3<sup>a</sup></b>	<b>7,7 ± 1,3<sup>a</sup></b>	<b>2,9 ± 0,3<sup>b</sup></b>	<b>8,4 ± 0,7<sup>a</sup></b>	<b>4,8 ± 0,6<sup>a</sup></b>	<b>1,7 ± 0,2<sup>b</sup></b>	<b>5,1 ± 0,3<sup>a</sup></b>
<b>AGPI n-6 + n-3</b>	<b>6,2 ± 1,0</b>	<b>6,3 ± 0,4</b>	<b>5,4 ± 1,0</b>	<b>13,9 ± 0,8</b>	<b>13,8 ± 0,6</b>	<b>13,1 ± 0,6</b>	<b>6,8 ± 0,7</b>	<b>7,2 ± 0,7</b>	<b>6,9 ± 0,4</b>
<b>20:4 n-6 / 22:6 n-3</b>	<b>1,3 ± 0,1<sup>a</sup></b>	<b>3,9 ± 0,4<sup>b</sup></b>	<b>1,0 ± 0,1<sup>c</sup></b>	<b>0,6 ± 0,2<sup>a</sup></b>	<b>1,5 ± 0,2<sup>b</sup></b>	<b>0,4 ± 0,1<sup>c</sup></b>	<b>0,3 ± 0,03<sup>a</sup></b>	<b>0,8 ± 0,04<sup>b</sup></b>	<b>0,2 ± 0,02<sup>a</sup></b>

**Annexe 1 : Teneur en acides gras des phospholipides membranaires (PC, GPE et PS) du cortex chez des rats ayant reçu un régime équilibré en AGPI n-6/n-3, un régime déficient en AGPI n-3 et un régime supplémenté en DHA.** PC : phosphatidylcholine ; GPE : glycérophospholipides à éthanolamine ; PS : phosphatidylsérine. Les valeurs sont exprimées en µmol d'acides gras / g de tissus sur la moyenne de 6 échantillons (± écart-type SD).

Acides Gras	PC			GPE			PS		
	Equilibré	Déficient	Supplémenté	Equilibré	Déficient	Supplémenté	Equilibré	Déficient	Supplémenté
14:0	0,3 ± 0,03	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,06
16:0	47,6 ± 1,04	48,5 ± 0,9	47,9 ± 1,3	6,1 ± 0,5	6,1 ± 0,4	5,7 ± 0,2	4,5 ± 0,8	3,8 ± 0,5	3,4 ± 0,3
18:0	11,2 ± 0,3	11,3 ± 0,4	12,2 ± 0,9	17,6 ± 0,8	19,2 ± 0,6	18,5 ± 0,3	36,6 ± 0,8	36,5 ± 1,1	36,6 ± 1,1
<b>Σ Saturés</b>	<b>59,9 ± 0,7</b>	<b>60,7 ± 0,7</b>	<b>61,0 ± 1,7</b>	<b>23,9 ± 1,04</b>	<b>25,6 ± 0,7</b>	<b>24,4 ± 0,3</b>	<b>41,9 ± 1,0</b>	<b>41,2 ± 0,7</b>	<b>41,2 ± 1,3</b>
16:1 n-9	0,3 ± 0,06	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,02	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,06 ± 0,03
16:1 n-7	0,5 ± 0,05	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,07	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
18:1 n-9	19,1 ± 0,3	18,5 ± 0,5	19,6 ± 0,7	8,6 ± 1,02	8,3 ± 1,03	9,7 ± 0,6	13,5 ± 1,1	12,9 ± 1,2	13,9 ± 0,4
18:1 n-7	5,5 ± 0,4	5,8 ± 0,2	4,9 ± 0,3	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,3	1,7 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,2
20:1 n-9	0,6 ± 0,04	0,6 ± 0,05	0,6 ± 0,04	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,1
<b>Σ Monoinsaturés</b>	<b>26,6 ± 0,5</b>	<b>26,2 ± 0,7</b>	<b>26,7 ± 0,9</b>	<b>11,5 ± 1,2</b>	<b>11,4 ± 1,4</b>	<b>12,8 ± 0,8</b>	<b>17,5 ± 1,1</b>	<b>16,7 ± 1,5</b>	<b>18,2 ± 0,9</b>
18:2 n-6	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,07	0,5 ± 0,8	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,08
20:3 n-6	0,2 ± 0,02	0,1 ± 0,02	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,04	0,2 ± 0,02	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,05	0,3 ± 0,06	0,7 ± 0,1
20:4 n-6	6,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	6,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	14,2 ± 2,9 <sup>a</sup>	12,9 ± 0,9 <sup>a</sup>	10,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	6,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,4 <sup>b</sup>
22:4 n-6	0,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,03 <sup>b</sup>	4,3 ± 0,5	5,1 ± 0,4	0,1 ± 0,05	2,5 ± 0,4	2,9 ± 0,2	1,9 ± 0,3
22:5 n-6	0,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	16,4 ± 1,2 <sup>b</sup>	3,3 ± 0,4 <sup>c</sup>	0,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	20,7 ± 1,3 <sup>b</sup>	0,7 ± 0,2 <sup>a</sup>
<b>Σ AGPI n-6</b>	<b>7,9 ± 0,5<sup>a</sup></b>	<b>11,1 ± 0,5<sup>b</sup></b>	<b>6,5 ± 0,3<sup>c</sup></b>	<b>20,0 ± 3,7<sup>a</sup></b>	<b>34,8 ± 1,5<sup>b</sup></b>	<b>14,8 ± 1,1<sup>c</sup></b>	<b>11,0 ± 0,6<sup>a</sup></b>	<b>31,2 ± 1,2<sup>b</sup></b>	<b>9,9 ± 0,6<sup>a</sup></b>
20:5 n-3	0,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,03	0,01 ± 0,04	0,03 ± 0,1	0,2 ± 0,05	0,1 ± 0,07	0,06 ± 0,08	0,1 ± 0,03
22:5 n-3	0,05 ± 0,04	0,01 ± 0,03	0,1 ± 0,05	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,01	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,08	0,02 ± 0,03	0,3 ± 0,03
22:6 n-3	5,04 ± 0,7 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	5,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	25,4 ± 2,6 <sup>a</sup>	9,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	27,2 ± 2,0 <sup>a</sup>	27,2 ± 1,7 <sup>a</sup>	9,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	28,0 ± 1,5 <sup>a</sup>
<b>Σ AGPI n-3</b>	<b>5,2 ± 0,7<sup>a</sup></b>	<b>1,7 ± 0,07<sup>b</sup></b>	<b>5,4 ± 0,6<sup>a</sup></b>	<b>25,6 ± 2,6<sup>a</sup></b>	<b>9,5 ± 0,5<sup>b</sup></b>	<b>28,0 ± 2,0<sup>a</sup></b>	<b>27,9 ± 1,8<sup>a</sup></b>	<b>9,4 ± 0,3<sup>b</sup></b>	<b>28,7 ± 1,5<sup>a</sup></b>
<b>AGPI n-6 + n-3</b>	<b>13,05 ± 0,3</b>	<b>12,8 ± 0,4</b>	<b>11,9 ± 0,8</b>	<b>45,6 ± 1,8</b>	<b>44,4 ± 1,1</b>	<b>42,9 ± 1,4</b>	<b>38,9 ± 1,8</b>	<b>40,6 ± 1,3</b>	<b>38,6 ± 1,8</b>
<b>20:4 n-6 / 22:6 n-3</b>	<b>1,25 ± 0,3<sup>a</sup></b>	<b>3,8 ± 0,4<sup>b</sup></b>	<b>0,95 ± 0,1<sup>c</sup></b>	<b>0,6 ± 0,2<sup>a</sup></b>	<b>1,4 ± 0,2<sup>b</sup></b>	<b>0,4 ± 0,1<sup>c</sup></b>	<b>0,2 ± 0,02<sup>a</sup></b>	<b>0,7 ± 0,04<sup>b</sup></b>	<b>0,2 ± 0,02<sup>a</sup></b>

**Annexe 2 : Teneur en acides gras des phospholipides membranaires (PC, GPE et PS) du cortex chez des rats ayant reçu un régime équilibré en AGPI n-6/n-3, un régime déficient en AGPI n-3 et un régime supplémenté en DHA.** PC : phosphatidylcholine ; GPE : glycérophospholipides à éthanolamine ; PS : phosphatidylsérine. Les valeurs sont exprimées en % d'acides gras totaux sur la moyenne de 6 échantillons (± écart-type SD).

Acides Gras	PC			GPE			PS		
	Equilibré	Déficient	Supplémenté	Equilibré	Déficient	Supplémenté	Equilibré	Déficient	Supplémenté
14:0	0,15 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,05	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,1 ± 0,01
16:0	26,1 ± 0,6	26,7 ± 1,5	25,6 ± 0,9	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1
18:0	7,1 ± 0,9	6,3 ± 0,5	6,4 ± 0,7	6,1 ± 0,2	6,1 ± 0,1	5,6 ± 0,3	7,4 ± 0,6	7,3 ± 0,6	7,5 ± 0,7
<b>Σ Saturés</b>	<b>33,8 ± 1,1</b>	<b>33,5 ± 1,5</b>	<b>32,5 ± 1,8</b>	<b>8,5 ± 0,3</b>	<b>8,5 ± 0,2</b>	<b>7,8 ± 0,4</b>	<b>8,6 ± 0,8</b>	<b>8,4 ± 0,7</b>	<b>8,7 ± 0,9</b>
16:1 n-9	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,05	0,2 ± 0,04	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,0	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,0	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,03
16:1 n-7	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,04	0,3 ± 0,04	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,04
18:1 n-9	10,9 ± 0,9	9,9 ± 1,1	10,5 ± 1,2	4,2 ± 0,8	3,2 ± 0,6	4,0 ± 1,1	3,1 ± 0,6	2,9 ± 0,5	3,3 ± 0,7
18:1 n-7	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,5	2,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,06	0,4 ± 0,1
20:1 n-9	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,03	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,04
<b>Σ Monoinsaturés</b>	<b>14,9 ± 1,1</b>	<b>13,9 ± 1,6</b>	<b>14,1 ± 1,5</b>	<b>5,5 ± 1,2</b>	<b>4,2 ± 0,8</b>	<b>5,1 ± 1,4</b>	<b>3,9 ± 0,7</b>	<b>3,7 ± 0,6</b>	<b>4,1 ± 0,8</b>
18:2 n-6	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,04	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,15 ± 0,02
20:3 n-6	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,02	0,2 ± 0,03	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,02
20:4 n-6	3,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	4,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,2 <sup>b</sup>	3,8 ± 0,2 <sup>c</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>a</sup>
22:4 n-6	0,4 ± 0,03	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,01	1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,03	0,6 ± 0,04	0,4 ± 0,03
22:5 n-6	0,1 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,2 ± 0,03 <sup>a</sup>	4,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,2 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>c</sup>
<b>Σ AGPI n-6</b>	<b>4,6 ± 0,3<sup>a</sup></b>	<b>6,0 ± 0,6<sup>b</sup></b>	<b>3,9 ± 0,2<sup>c</sup></b>	<b>6,7 ± 0,3<sup>a</sup></b>	<b>11,2 ± 0,5<sup>b</sup></b>	<b>5,4 ± 0,3<sup>c</sup></b>	<b>2,0 ± 0,1</b>	<b>5,5 ± 0,3<sup>b</sup></b>	<b>2,1 ± 0,2</b>
20:5 n-3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,04 ± 0,01	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,02	0,02 ± 0,0	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01
22:5 n-3	0,03 ± 0,01	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,02 ± 0,0	0,2 ± 0,03	0,1 ± 0,1	0,02 ± 0,0	0,1 ± 0,03
22:6 n-3	1,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,2 <sup>c</sup>	7,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,2 <sup>b</sup>	8,1 ± 0,5 <sup>c</sup>	3,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	5,0 ± 0,4 <sup>c</sup>
<b>Σ AGPI n-3</b>	<b>1,7 ± 0,1<sup>a</sup></b>	<b>0,6 ± 0,1<sup>b</sup></b>	<b>2,1 ± 0,1<sup>c</sup></b>	<b>7,2 ± 0,4<sup>a</sup></b>	<b>2,8 ± 0,2<sup>b</sup></b>	<b>8,4 ± 0,5<sup>c</sup></b>	<b>4,0 ± 0,4<sup>a</sup></b>	<b>1,9 ± 0,1<sup>b</sup></b>	<b>5,2 ± 0,4<sup>c</sup></b>
<b>AGPI n-6 + n-3</b>	<b>4,7 ± 0,3</b>	<b>6,6 ± 0,6</b>	<b>5,9 ± 0,2</b>	<b>13,8 ± 0,6</b>	<b>14,1 ± 0,7</b>	<b>13,8 ± 0,8</b>	<b>6,1 ± 0,5</b>	<b>7,4 ± 0,3</b>	<b>7,3 ± 0,5</b>
<b>20:4 n-6 / 22:6 n-3</b>	<b>2,2 ± 0,2<sup>a</sup></b>	<b>7,0 ± 0,1<sup>b</sup></b>	<b>1,6 ± 0,2<sup>c</sup></b>	<b>0,6 ± 0,04<sup>a</sup></b>	<b>1,8 ± 0,1<sup>b</sup></b>	<b>0,5 ± 0,03<sup>c</sup></b>	<b>0,3 ± 0,02<sup>a</sup></b>	<b>0,8 ± 0,03<sup>b</sup></b>	<b>0,2 ± 0,02<sup>c</sup></b>

**Annexe 3 : Teneur en acides gras des phospholipides membranaires (PC, GPE et PS) de l'hippocampe chez des rats ayant reçu un régime équilibré en AGPI n-6/n-3, un régime déficient en AGPI n-3 et un régime supplémenté en DHA.** PC : phosphatidylcholine ; GPE : glycérophospholipides à éthanolamine ; PS : phosphatidylsérine. Les valeurs sont exprimées en µmol d'acides gras/ g de tissus sur la moyenne de 6 échantillons (± écart-type SD).

Acides Gras	PC			GPE			PS		
	Equilibré	Déficient	Supplémenté	Equilibré	Déficient	Supplémenté	Equilibré	Déficient	Supplémenté
14:0	0,24 ± 0,02	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,05	0,2 ± 0,05
16:0	43,6 ± 1,2	46,4 ± 1,6	45,5 ± 1,3	5,3 ± 0,2	5,7 ± 0,3	5,4 ± 0,2	3,9 ± 0,8	3,7 ± 0,7	3,9 ± 0,1
18:0	13,6 ± 1,1	12,1 ± 1,0	12,4 ± 0,7	16,1 ± 0,5	17,5 ± 0,9	10,9 ± 2,8	37,8 ± 1,03	35,4 ± 1,0	34,8 ± 0,9
<b>Σ Saturés</b>	<b>58,5 ± 1,2</b>	<b>59,6 ± 0,8</b>	<b>59,1 ± 0,8</b>	<b>21,9 ± 0,6</b>	<b>23,7 ± 1,1</b>	<b>16,6 ± 3,0</b>	<b>43,7 ± 1,7</b>	<b>40,5 ± 0,8</b>	<b>40,2 ± 1,1</b>
16:1 n-9	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,4 ± 0,13	0,3 ± 0,1
16:1 n-7	0,4 ± 0,03	0,4 ± 0,05	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,05	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,03	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,2
18:1 n-9	20,4 ± 1,1	18,4 ± 0,9	20,5 ± 1,01	11,4 ± 1,1	9,1 ± 1,2	11,1 ± 2,1	16,2 ± 1,1	13,9 ± 1,4	15,4 ± 2,0
18:1 n-7	5,6 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,1 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,3	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,2	1,8 ± 0,2
20:1 n-9	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,04	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,2
<b>Σ Monoinsaturés</b>	<b>28,1 ± 1,4</b>	<b>25,7 ± 1,2</b>	<b>27,4 ± 1,2</b>	<b>15,3 ± 1,3</b>	<b>12,2 ± 1,6</b>	<b>14,3 ± 2,7</b>	<b>20,2 ± 1,3</b>	<b>17,7 ± 1,6</b>	<b>19,0 ± 2,3</b>
18:2 n-6	0,5 ± 0,03	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,6 ± 0,04	0,5 ± 0,03	0,7 ± 0,1
20:3 n-6	0,2 ± 0,04	0,1 ± 0,01	0,3 ± 0,02	0,4 ± 0,03	0,3 ± 0,04	0,5 ± 0,04	0,5 ± 0,02	0,3 ± 0,03	0,8 ± 0,1
20:4 n-6	7,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	8,7 ± 1,0 <sup>a</sup>	6,7 ± 0,7 <sup>b</sup>	12,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	14,7 ± 0,8 <sup>b</sup>	11,7 ± 1,3 <sup>c</sup>	5,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,4 ± 0,5 <sup>b</sup>	5,9 ± 0,5 <sup>a</sup>
22:4 n-6	0,8 ± 0,04	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,05	5,2 ± 0,1	6,3 ± 0,3	3,6 ± 0,3	3,2 ± 0,2	3,6 ± 0,1	2,0 ± 0,2
22:5 n-6	0,1 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	13,8 ± 0,7 <sup>b</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>c</sup>	1,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	18,3 ± 1,2 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,5 <sup>c</sup>
<b>Σ AGPI n-6</b>	<b>9,2 ± 0,4<sup>a</sup></b>	<b>12,7 ± 1,0<sup>b</sup></b>	<b>8,1 ± 0,7<sup>c</sup></b>	<b>19,2 ± 0,9<sup>a</sup></b>	<b>35,4 ± 1,3<sup>b</sup></b>	<b>16,7 ± 1,6<sup>c</sup></b>	<b>11,4 ± 0,5<sup>a</sup></b>	<b>30,2 ± 1,5<sup>b</sup></b>	<b>10,7 ± 0,5<sup>a</sup></b>
20:5 n-3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,03	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,04	0,1 ± 0,03	0,05 ± 0,04	0,1 ± 0,1
22:5 n-3	0,1 ± 0,02	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,02	0,3 ± 0,03	0,1 ± 0,01	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,3	0,1 ± 0,03	0,5 ± 0,2
22:6 n-3	3,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	4,4 ± 0,2 <sup>c</sup>	21,4 ± 1,0 <sup>a</sup>	9,2 ± 0,5 <sup>b</sup>	26,7 ± 1,4 <sup>c</sup>	22,5 ± 1,7 <sup>a</sup>	9,9 ± 0,9 <sup>b</sup>	27,2 ± 3,2 <sup>c</sup>
<b>Σ AGPI n-3</b>	<b>3,7 ± 0,3<sup>a</sup></b>	<b>1,4 ± 0,1<sup>b</sup></b>	<b>4,7 ± 0,2<sup>c</sup></b>	<b>21,8 ± 1,0<sup>a</sup></b>	<b>9,3 ± 0,5<sup>b</sup></b>	<b>27,6 ± 1,3<sup>c</sup></b>	<b>23,2 ± 1,7<sup>a</sup></b>	<b>10,3 ± 0,9<sup>b</sup></b>	<b>28,1 ± 3,2<sup>c</sup></b>
<b>AGPI n-6 + n-3</b>	<b>12,8 ± 0,2</b>	<b>14,1 ± 0,9</b>	<b>12,8 ± 0,8</b>	<b>41,0 ± 1,6</b>	<b>44,8 ± 1,6</b>	<b>44,3 ± 2,9</b>	<b>34,6 ± 1,9</b>	<b>40,6 ± 2,3</b>	<b>38,8 ± 3,2</b>
<b>20:4 n-6 / 22:6 n-3</b>	<b>2,1 ± 0,3<sup>a</sup></b>	<b>6,2 ± 0,9<sup>b</sup></b>	<b>1,5 ± 0,2<sup>c</sup></b>	<b>0,6 ± 0,04<sup>a</sup></b>	<b>1,6 ± 0,1<sup>b</sup></b>	<b>0,4 ± 0,03<sup>c</sup></b>	<b>0,3 ± 0,02<sup>a</sup></b>	<b>0,8 ± 0,03<sup>b</sup></b>	<b>0,2 ± 0,02<sup>c</sup></b>

**Annexe 4 : Teneur en acides gras des phospholipides membranaires (PC, GPE et PS) de l'hippocampe chez des rats ayant reçu un régime équilibré en AGPI n-6/n-3, un régime déficient en AGPI n-3 et un régime supplémenté en DHA.** PC : phosphatidylcholine ; GPE : glycérophospholipides à éthanolamine ; PS : phosphatidylsérine. Les valeurs sont exprimées en % d'acides gras totaux sur la moyenne de 6 échantillons (± écart-type SD).

	FOIE						PLASMA		
	PC			GPE			PC		
Acides Gras	Equilibré	Déficient	Supplémenté	Equilibré	Déficient	Supplémenté	Equilibré	Déficient	Supplémenté
14:0	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,06	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,2 ± 0,03	0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,05
16:0	23,6 ± 2,1	22,1 ± 1,4	24,8 ± 1,1	15,9 ± 0,8	15,3 ± 0,5	18,4 ± 0,8	23,8 ± 0,9	21,4 ± 1,2	27,0 ± 1,2
18:0	17,8 ± 1,2	19,8 ± 2,0	17,6 ± 1,1	20,1 ± 1,5	20,5 ± 1,4	21,4 ± 0,6	17,3 ± 2,1	20,1 ± 1,3	17,8 ± 1,2
<b>Σ Saturés</b>	<b>42,3 ± 2,1</b>	<b>42,8 ± 2,4</b>	<b>43,7 ± 0,7</b>	<b>36,6 ± 1,0</b>	<b>36,4 ± 1,4</b>	<b>40,6 ± 1,0</b>	<b>42,3 ± 1,7</b>	<b>42,7 ± 0,7</b>	<b>46,5 ± 1,1</b>
16:1 n-9	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,03	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,03
16:1 n-7	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,04	0,5 ± 0,06	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,08
18:1 n-9	6,5 ± 0,9	6,8 ± 0,8	7,6 ± 0,6	4,1 ± 0,5	4,9 ± 0,9	3,3 ± 0,4	6,3 ± 0,3	6,8 ± 0,7	7,7 ± 0,5
18:1 n-7	3,3 ± 0,4	2,7 ± 0,3	1,9 ± 0,2	2,3 ± 0,2	1,9 ± 0,4	1,1 ± 0,3	3,0 ± 0,3	2,5 ± 0,2	2,0 ± 0,1
20:1 n-9	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,05	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,04	0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,03
<b>Σ Monoinsaturés</b>	<b>10,9 ± 1,3</b>	<b>10,5 ± 1,2</b>	<b>10,6 ± 0,7</b>	<b>7,0 ± 0,7</b>	<b>7,4 ± 1,2</b>	<b>4,9 ± 0,6</b>	<b>10,5 ± 0,4</b>	<b>10,4 ± 0,9</b>	<b>10,8 ± 0,5</b>
18:2 n-6	6,2 ± 0,4	5,0 ± 0,3	8,8 ± 0,6	2,9 ± 0,2	2,9 ± 0,5	3,6 ± 0,5	8,0 ± 0,3	6,4 ± 0,6	11,5 ± 0,8
20:3 n-6	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,04	1,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,05	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,05	1,2 ± 0,1
20:4 n-6	30,7 ± 2,3	33,6 ± 1,7	19,0 ± 1,4	29,9 ± 1,3	34,4 ± 2,1	17,5 ± 1,1	29,6 ± 1,4	31,3 ± 1,1	16,0 ± 1,1
22:4 n-6	0,1 ± 0,03	0,5 ± 0,07	0,1 ± 0,01	0,4 ± 0,1	1,5 ± 0,2	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,02	0,6 ± 0,1	0,05 ± 0,03
22:5 n-6	0,2 ± 0,03	5,5 ± 0,9	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,1	11,1 ± 1,9	0,3 ± 0,04	0,2 ± 0,04	5,9 ± 1,1	0,2 ± 0,02
<b>Σ AGPI n-6</b>	<b>37,8 ± 2,2</b>	<b>44,8 ± 2,2</b>	<b>29,5 ± 1,1</b>	<b>33,8 ± 1,4</b>	<b>50,1 ± 1,4</b>	<b>22,0 ± 1,2</b>	<b>38,7 ± 1,5</b>	<b>44,9 ± 1,1</b>	<b>29,1 ± 1,2</b>
20:5 n-3	0,2 ± 0,05	0,00 ± 0,00	2,03 ± 0,5	0,5 ± 0,1	0,01 ± 0,03	2,8 ± 0,4	0,2 ± 0,04	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,3
22:5 n-3	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,01	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,5 ± 0,04	0,1 ± 0,01	0,6 ± 0,05
22:6 n-3	7,6 ± 1,1	1,3 ± 0,2	13,1 ± 0,7	18,5 ± 1,5	3,6 ± 0,9	26,9 ± 2,1	7,1 ± 0,6	1,2 ± 0,05	10,9 ± 1,0
<b>Σ AGPI n-3</b>	<b>8,5 ± 1,2</b>	<b>1,5 ± 0,1</b>	<b>16,0 ± 0,8</b>	<b>20,4 ± 1,6</b>	<b>4,1 ± 1,1</b>	<b>30,8 ± 2,0</b>	<b>8,0 ± 0,6</b>	<b>1,5 ± 0,1</b>	<b>13,2 ± 1,2</b>
<b>AGPI n-6 + n-3</b>	<b>46,3 ± 3,2</b>	<b>46,3 ± 2,3</b>	<b>45,4 ± 0,8</b>	<b>54,2 ± 0,9</b>	<b>54,1 ± 1,5</b>	<b>52,9 ± 1,4</b>	<b>46,7 ± 1,8</b>	<b>46,4 ± 1,1</b>	<b>42,3 ± 1,5</b>
<b>20:4 n-6 / 22:6 n-3</b>	<b>4,1 ± 0,4</b>	<b>26,5 ± 2,0</b>	<b>1,5 ± 0,1</b>	<b>1,6 ± 0,2</b>	<b>10,1 ± 1,9</b>	<b>0,7 ± 0,1</b>	<b>4,2 ± 0,3</b>	<b>25,8 ± 1,2</b>	<b>1,5 ± 0,2</b>

**Annexe 5 : Teneur en acides gras des phospholipides membranaires PC, GPE du foie et PC du plasma chez des rats ayant reçu un régime équilibré en AGPI n-6/n-3, un régime déficient en AGPI n-3 et un régime supplémen-té en DHA.** PC : phosphatidylcholine ; GPE : glycérophospholipides à éthan-olamine. Les valeurs sont exprimées en % d'acides gras totaux sur la moyenne de 6 échantillons (± écart-type SD).



	Gènes	Témoign Non Activé	
		Cx	CA1
Transporteurs	GLUT1	15,7±2,4	23,0±1,8
	GLUT3	9,6±1,2	12,5 ±0,6
	MCT1	5,5±0,2	7,3±0,1
	MCT4	0,3±0,01	0,2±0,01
	MCT2	5,2±0,9	6,9±0,7
	GLT1	220,2±23,1	261,8±11,1
	GLAST	65,7±9,7	64,5±6,8
NaK ATPase	Atp1a2	105,1±11,5	121,4±7,5
	Atp1a3	89,8±14,1	148,1±15,4
Glycolyse	Hk1	36,8±3,2	32,2±3,7
	Pfkm	34,2±3,9	28,3±2,4
	Pfkm	28,7±3,6	30,8±2,1
	Gpi	59,5±2,2	60,6±3,1
	GAPDH	295,2±25,4	267,8±32,4
	Pgk1	42,0±5,5	68,3±10,5
	Eno1	188,9±38,0	255,8±24,0
	Eno2	65,3±7,5	94,2±7,6
Glycogénèse	Pkm2	89,8±14,3	105,9±10,6
	Gsk3a	52,1±6,3	69,5±9,3
Métabolisme du lactate	Gsk3b	22,8±2,5	29,3±1,1
	Ldha	24,8±5,9	38,1±5,5
Métabolisme du pyruvate	Ldha	51,6±6,8	60,6±1,3
	Pdha1	20,4±2,2	29,4±1,0
Métabolisme du glutamate	Pdha2	9,9±2,4	16,1±1,4
	Gls	28,0±2,6	16,0±1,2
Métabolisme mitochondrial	Glul	261,2±16,8	248,0±24,0
	Ndufa5	34,4±2,3	55,4±7,4
	Sdha	43,2±4,3	59,6±1,9
	Uqcrc 1	8,5±1,1	8,1±0,7
	Uqcrc 2	29,0±3,8	29,4±1,9
	Cox6c	85,2±8,6	61,6±4,4
	Cox8a	118,0±16,7	163,4±34,5
	Atp5g1	11,9±2,4	15,7±1,3
	Atp5h	44,1±4,5	80,7±13,3
	Atp5j	37,8±5,9	28,9±1,8
	Atp5d	59,4±4,3	60,4±3,3
	Atp5b	120,0±12,1	118,1±7,2
Cycle de Krebs	Atp5o	76,5±14,7	61,6±3,9
	Cs	17,7±2,5	27,7±1,5
	Idh3g	16,3±2,7	15,2±1,1
	Mdh1	88,7±4,8	91,8±8,2
	Mdh2	38,8±5,4	32,5±3,3
	Me1	5,4±1,0	6,6±1,3

Annexe 6 : Comparaison de l'abondance relative de chaque gène du métabolisme énergétique étudié entre les 2 zones cérébrales de notre étude.



## **Congrès JFN (Journées Francophones de Nutrition), Brest, 2008 et EUROGLIA, Paris, 2009**

### **Acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 et expression des gènes du métabolisme énergétique dans le cortex cérébral du rat au repos ou en situation d'activation**

Harbeby E.<sup>1\*</sup>, Jouin M.<sup>1</sup>, Penke-Verdier Z.<sup>2</sup>, Langelier B.<sup>1</sup>, Lallemand MS.<sup>1</sup>, Linard A.<sup>1</sup>, Alessandri JM.<sup>1</sup>, Denis I.<sup>1</sup>, Lavalie M.<sup>1</sup>, Guesnet P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité NuRéLiCe, INRA UR909, Jouy-en-Josas, France. <sup>2</sup>Laboratoire NAMC, CNRS UMR8620, Université Paris Sud ORSAY, France.\*Thèse cofinancée INRA-LESIEUR

#### **Introduction et but de l'étude**

Le métabolisme énergétique cérébral et l'utilisation du glucose, fortement impliqués dans la production d'énergie lors d'une activation neuronale, sont potentiellement modulables par les AGPI n-3. Des travaux précédents ont mis en évidence chez le rat déficient en n-3 une diminution de l'utilisation cérébrale du glucose liée à une moindre densité des transporteurs de glucose GLUT1, et de la phosphorylation oxydative (activité cytochrome c oxydase). L'impact de ces altérations sur le métabolisme énergétique cérébral du rat en situation d'activation n'est pas connu. Notre objectif est d'évaluer les répercussions de cet état de déficience sur le niveau d'expression de 46 gènes clés du métabolisme énergétique (transporteurs, glycolyse, cycle de Krebs, phosphorylation oxydative...) au niveau du cortex fronto-pariétal chez le rat au repos ou en situation d'activation.

#### **Matériel et méthode**

Des rats Wistar mâles ont reçu depuis leur conception un régime équilibré en n-6/n-3 (groupe Témoin) ou spécifiquement déficient en n-3 (groupe Déficient). A l'âge de 8 semaines, l'activation du cortex fronto-pariétal a été réalisée chez la moitié des animaux par exposition à un environnement enrichi vérifiée par la révélation de la protéine c-Fos (immunohistochimie). La composition en acides gras des trois principales classes de phospholipides (PE, PC, PS) a été analysée par CPG, et l'expression des ARNm par RT-PCR en temps réel sur des cartes à faible densité (Taqman Low Density Array).

#### **Résultats**

La déficience en n-3 altère la teneur en AGPI des phospholipides membranaires : diminution de 67% de la teneur en acide docosahexaénoïque (22 :6n-3), compensée par l'augmentation de l'acide docosapentaénoïque (22 :5n-6). La déficience provoque également des modifications d'expression d'une dizaine de gènes chez les rats placés en condition basale : augmentation des ARNm de MCT2, de LDH5, et de la sous unité catalytique de la pompe Na/K-ATPase, augmentation ou diminution affectant 4 des complexes de la phosphorylation oxydative: complexes II (Sdha), III (Uqcrc1, Uqcrc2), IV (Cox6c) et V (Atp5d, Atp5b). Le niveau de GLUT1 est diminué (-33%) en condition basale, et bien que l'activation augmente son expression, les rats déficients activés présentent un niveau d'expression corticale de GLUT1 qui reste équivalent à celui des rats témoins au repos.

#### **Conclusion**

La moindre densité du transporteur GLUT1 chez le rat déficient en n-3 pourrait s'expliquer par la réduction de la transcription du gène. Nos résultats montrent pour la première fois que cette réduction persiste en situation d'activation cérébrale, confortant notre hypothèse d'une altération consécutive du métabolisme du glucose. Des modifications de l'expression de MCT2 et de la LDH5, de la Na/K-ATPase et des complexes de la chaîne de phosphorylation oxydative indiquent que le métabolisme du lactate et la synthèse de l'ATP sont également perturbés par la déficience en n-3, ce qui pourrait ouvrir de nouveaux champs d'investigation.

OMEGA-3 FATTY ACIDS AND BRAIN GLUCOSE UTILIZATION: AN  $^{18}\text{F}$ -FLUORODEOXYGLUCOSE POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY (FDG-PET) STUDY IN THE RAT

E. Harbeby, S. Tremblay<sup>1,2</sup>, J. Mercier-Tremblay<sup>1</sup>, M. Archambault<sup>2</sup>, M. Roy<sup>1</sup>, JF Beaudoin<sup>2</sup>, J. Rousseau<sup>2</sup>, A. Huertas<sup>3</sup>, P. Guesnet, R. Lecomte<sup>2</sup> and S.C. Cunnane<sup>1</sup>

NuRéLiCe INRA Jouy-en-Josas, France, <sup>1</sup>The Research Center on Aging, <sup>2</sup>Departement of Nuclear Medicine and Radiobiology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, and <sup>3</sup>Lesieur, Asnières-sur-Seine, France.

**Background** – Several *in vivo* and *in vitro* studies suggest that docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 $\omega$ 3), the main omega-3 fatty acids of brain membranes, may be a regulator of brain energy metabolism by affecting glucose metabolism and its transporter GLUT1.

**Objective** – The purpose of this study was to evaluate whether cerebral glucose metabolism measured by FDG-PET would reflect decreased GLUT1 expression in the brain of omega-3 deficient rats.

**Methods** – We measured the cerebral metabolic rate for glucose with FDG-PET for small animal (microPET) in adult rats (10 wk-old) receiving an omega-3 fatty acid-adequate (control,  $n = 6$ ) or an omega-3 fatty acid-deficient (omega-3 def,  $n = 6$ ) diet. Dynamic PET scans were performed during 45 min after injection of  $^{18}\text{F}$ -FDG (60 MBq). Data were reconstructed and superposed with MRI slices of the rat brain to calculate radioactivity in regions of interest (ROIs). Fatty acid content in brain phospholipid classes was determined by gas chromatography and the mRNA and protein expression of GLUT1 using real-time PCR (TaqMan low-density array, TLDA) and western blotting, respectively.

**Results** – Omega-3 PUFA-deficient rats had 60-70% lower DHA in their brain membrane phospholipids. Significantly decreased  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake was observed in the brain of omega-3 deficient rats, corresponding to both a lower rate of FDG uptake during the early phase (0-15 min) and a lower plateau level of  $^{18}\text{F}$ -FDG incorporation during the later plateau phase (15-45 min). The gene and protein expression of GLUT1 was also lower in the omega-3 def group.

**Conclusion** – In rats deficient in omega-3 PUFA, lower expression of GLUT1 in the brain is consistent with *in vivo* results using FDG-PET that show glucose hypometabolism in the brain. Dietary intake of omega-3 fatty acids therefore clearly appears to modulate brain glucose uptake, a mechanism by which omega-3 fatty acid status may influence cognitive function known to be at risk during aging.

**Acknowledgements.** Financial support was provided by the Canada Research Chaires (SCC), CIHR, INRA and E. Harbeby was supported by grants from Lesieur and INRA.